



HAL
open science

Paludisme : épidémiologie, diagnostic, traitement, et contrôle, des voyageurs au territoire amazonien.

Lise Musset

► To cite this version:

Lise Musset. Paludisme : épidémiologie, diagnostic, traitement, et contrôle, des voyageurs au territoire amazonien.. Maladies infectieuses. Université de Guyane, 2020. tel-03430690v1

HAL Id: tel-03430690

<https://hal.science/tel-03430690v1>

Submitted on 16 Nov 2021 (v1), last revised 8 Jan 2022 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Epidémiologie, diagnostic, traitement, et contrôle du paludisme: des voyageurs au territoire amazonien

Lise Musset

► To cite this version:

Lise Musset. Epidémiologie, diagnostic, traitement, et contrôle du paludisme: des voyageurs au territoire amazonien. Santé publique et épidémiologie. Université de Guyane, 2020. tel-03430690

HAL Id: tel-03430690

<https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-03430690>

Submitted on 16 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Mémoire

En vue de l'obtention de
Habilitation à Diriger des Recherches

Présentée et soutenue publiquement le 11 décembre 2020 par :
LISE MUSSET

**Paludisme : épidémiologie, diagnostic,
traitement, et contrôle,
des voyageurs au territoire amazonien.**

Frédéric ARIEY
Françoise BENOIT-VICAL
Antoine BERRY
Félix DJOSSOU
Sandrine HOUZE
Mathieu NACHER
Magalie PIERRE-DEMAR

JURY
PU-PH
DR
PU-PH
PU-PH
PU-PH
PU-PH
PU-PH

Rapporteur
Rapporteuse
Rapporteur
Examinateur
Examinatrice
Examinateur
Tutrice

Université de Guyane

Ecole Doctorale n°587 : Diversités, Santé et Développement en Amazonie

*En présence des maitres de la faculté,
des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure,*

***D'honorer ceux qui m'ont instruit** dans les préceptes de mon art
et de leur témoigner reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;*

***D'exercer dans l'intérêt de la santé publique,** ma profession avec conscience,
et de respecter non seulement la législation en vigueur,
mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

***De ne jamais oublier ma responsabilité
et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.***

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

Serment de Galien

Remerciements

A Messieurs Jacques LE BRAS, David FIDOCK, André SPIEGEL
Professeurs et chercheurs dans le domaine du paludisme.

Pour m'avoir fait partager votre expérience scientifique et professionnelle,
Pour m'avoir accompagnée avec autant de confiance, de respect et d'humanité,
Pour avoir cru en moi,

Je vous dédie ce travail,
Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
et de mon plus profond respect.

Une fois n'est pas coutume,
Je souhaiterais présenter mes remerciements pour mes proches,
Car cette profession impose une perpétuelle remise en question,
Et peut être rude en jugements et objectifs fixés,
Sans un entourage bienveillant et soutenant,
Difficile de tenir la barre,

À ma famille,

Charly, Ysée, Yness, Yriss,
Pour votre soutien et votre amour qui me sont si précieux,
Charly, pour ton discernement et ta capacité à me ramener si souvent à l'essentiel,
Ysée, Yness, Yriss, vous êtes toute ma fierté et n'oubliez jamais comme je vous aime,

À ma mère,

Pour ton amour, ta confiance, ton soutien,
Pour ton idéalisme qui nous pousse toujours plus loin,
Pour ton sens des valeurs,

À mon père,

Pour ton amour, ta confiance et ton soutien,
Pour ta gentillesse et ta candeur,
Pour ton analyse du milieu professionnel,

À mes grands-parents, *Geneviève, Sabine, Robert et Jacques,*

Pour votre amour attentionné,
Pour votre dévouement exemplaire,
Pour tous les principes que vous m'avez transmis,
Pour votre soutien qui m'a permis de me construire,

À mes soeurs,

Pour votre amour et votre soutien,
Pour votre gentillesse et votre douceur,
Pour votre grande ouverture d'esprit,

À mes amis, *Warinah, Véronique, Violaine, Sophie, Caroline F, Caroline SP, Sarah, ...*

Pour votre oreille attentive, qui écoute sans juger,
Pour votre soutien inconditionnel et vos conseils,

Au reste de la smala, *Claudette, Philippe, oncles et tantes paternels, Carine...*

Pour votre générosité, votre disponibilité et votre amour,

Une dédicace particulière à *Manon,*

Pour sa relecture attentive de ce document

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'équilibre que
vous m'apporté,
Je vous en suis très reconnaissante,
Merci du fond du cœur d'être là.

A ma tutrice, Madame Magalie PIERRE-DEMAR

Professeure, Université de Guyane,

Pour m'avoir accompagnée dans la construction de ce document,
Pour m'accorder sa confiance au fil de nos collaborations,

Aux Membres du Jury

Professeurs

Madame **Françoise BENOIT-VICAL**, rapporteure,

Monsieur **Frédéric ARIEY**, rapporteur,

Monsieur **Antoine BERRY**, rapporteur,

Madame **Sandrine HOUZE**,

Monsieur **Félix DJOSSOU**,

Monsieur **Mathieu NACHER**,

Pour avoir consacré une partie de votre temps à la critique de ce travail,
Pour m'avoir fait l'honneur de partager vos expériences et vos connaissances,

Trouvez ici l'expression de ma gratitude,
et de mon plus profond respect.

Aux membres successifs du laboratoire de parasitologie

Par ordre d'ancienneté,
Nicolle GUINGUINCOIN,
Béatrice VOLNEY,
Eric LEGRAND,
Yassamine LAZREK-SANDOT,
Luana MATHIEU,
Manon DISCOUR,
Olivier MORICEAU,
Catherine HALBOUT,
Célia FLORIMOND,
Maylis HUGHUIN,
Simon ROQUES,
Damien DONATO,
Jessica CASTERAS.

Pour votre précieuse contribution à ce travail,
Pour le plaisir de travailler avec vous au quotidien,
Pour votre disponibilité,
Pour votre implication,
Pour votre rigueur,

Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
Ce travail est aussi le vôtre.

A mes compagnons de galère,

Pour votre soutien permanent,
Pour votre écoute,
Pour ta relecture attentive,

Un jour c'est certain, les choses s'apaiseront,
et retrouveront sens et humanité,
Trouvez ici force et courage.

Aux chercheurs avec qui je collabore ou ai collaboré,

Emilie MOSNIER
Maylis DOUINE
Sachel MOK
Dan NEAFSEY
Jérôme CLAIN
Martha MAGRIS
Stephen VREDEN
Marc THELLIER
Bruno PRADINES
Marcus LACERDA
Lucie PALOQUE
Ivo MULLER
Didier MENARD
Socrates HERRERA
Et tant d'autres...

Pour votre rigueur scientifique, votre pertinence et votre disponibilité,
Sans collaboration la recherche n'est rien,

Aux jeunes scientifiques que j'ai eu la chance d'encadrer,

Un clin d'œil particulier à
Luana MATHIEU,
Léna BERTHELOT,
Christophe HEUGAS,
Mélanie TROUVAY,
Arielle SALMIER,
Sans oublier les autres,

Pour l'intérêt que vous avez porté à notre laboratoire et nos thématiques,
Pour votre implication dans nos projets partagés,

Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
Ce travail est aussi le vôtre.

Aux personnels des autorités sanitaires et programmes nationaux que j'ai pu côtoyer,

Organisation mondiale de la Santé,

Pascal RINGWALD,
Florence FOUQUE,

Organisation Panaméricaine de la Santé

Keither CARTER,
Maria-Paz ADE,
Prabjhot SINGH,
Roberto MONTOYA,
Rainier ESCALADA,

Direction Générale de la Santé

Bernadette WORMS,

Agence Régionale de Santé

Alice SANNA,
Jean-Marc FISHER,

Ministère de la santé du Guyana

Horace COX,

Programme national de lutte contre le paludisme

Helen HIWAT, Suriname,
Paola MARCHESINI, Brésil,
Ana-Carolina SANTELLI, Brésil.

Pour votre confiance envers le laboratoire et l'expertise qu'il vous apporte,
Pour m'avoir fait l'honneur de partager vos expériences et vos attentes,
Pour avoir construit ensemble une vision partagée dans l'intérêt des populations,
Pour tous les moments de convivialité partagés aux quatre coins des Amériques,

Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
et de mon plus profond respect.

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	9
Table des illustrations	10
Curriculum vitae	11
Etat civil.....	12
Fonctions	12
Statut professionnel.....	12
Formation initiale et diplômes.....	12
Publications scientifiques.....	13
Activités d'expertise	17
Organisation de conférences.....	19
Transmission de savoirs - Formation à la recherche	20
Diffusion de savoir auprès des professionnels de santé	22
Activités pédagogiques et d'enseignements, diffusion grand public	22
Financements obtenus	23
Participation aux jurys de concours.....	24
Société savante et organisation professionnelle	24
Communications scientifiques (hors expertise)	24
Résumé de mon parcours	29
Activités de recherche	34
COMPREHENSION ET DYNAMIQUE DES RESISTANCES AUX ANTIPALUDIQUES	35
Résistance de <i>P. falciparum</i> à l'atovaquone/proguanil : déterminants et évolution	39
Le gène <i>pfcr1</i> : marqueur de résistance à la chloroquine mais pas que.....	43
Résistance aux dérivés de l'artémisinine, REAGIR si l'histoire se répète	49
ETUDE DE <i>PLASMODIUM VIVAX</i> EN GUYANE	56
Evaluation de la prévalence des mutations des gènes <i>pvdhfr</i> et <i>pvdhps</i> en Guyane.....	57
Génotype <i>pvm-dr1</i> et résistance de <i>Plasmodium vivax</i> à la chloroquine en Guyane	57
Efficacité thérapeutique de la chloroquine de <i>Plasmodium vivax</i> en Guyane entre 2009 et 2015	58
Etude de la diversité génétique de <i>P. vivax</i> en Guyane.....	58
UNE RECHERCHE OPERATIONNELLE AU SERVICE DU CONTROLE DU PALUDISME	61
Performances des méthodes de diagnostic utilisées dans le cadre de la prise en charge du paludisme	61
Caractérisation des zones de transmission guyanaises et actions	65
SYNTHESE DES PERSPECTIVES	76
Compétences transversales	79
Surveillance et expertise en santé publique	80
Construction et animation d'un réseau de collaborateurs/partenaires	81
Administration de la recherche	83
Déploiement de la norme NF EN ISO 15189 au laboratoire	84
Conseillère en radioprotection.....	85
Encadrement d'équipe et management.....	86
Mise en perspective de mon parcours	87
Bibliographie	89
Annexes	92

Table des illustrations

Figure 1. Présentation synthétique de mon parcours.....	31
Figure 2. Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i> , charge parasitaire et antipaludiques.....	36
Figure 3. Emergence et dispersion de la résistance à la chloroquine chez <i>Plasmodium falciparum</i>	38
Figure 4. Réseau haplotypique des génomes mitochondriaux sensibles et résistants à l'atovaquone.	41
Figure 5. Principe du modèle utilisé.....	42
Figure 6. Mutations PfCRT impliquées dans la résistance à la chloroquine ou à la pipéraquline.	43
Figure 7. Impact de la séquence AttB sur l'expression du gène <i>pfcr</i> t marqué à la GFP.....	44
Figure 8. Sensibilité <i>in vitro</i> à la chloroquine de 3D7, D10 et GCO3 exprimant l'haplotype <i>pfcr</i> t 7G8.	45
Figure 9. Réversion de la résistance à la chloroquine en Guyane, caractérisation et temporalité.	46
Figure 10. Répartition de <i>pfcr</i> t C350R en Amazonie.....	47
Figure 11. Mutation <i>pfk13</i> C580Y au Guyana, 2016-2017, répartition (A) et origine (B).	51
Figure 12. Caractérisation des mutants <i>pfk13</i> C580Y, Guyana, 2016-2017.....	52
Figure 13. Distribution des mutations <i>pfk13</i> en Amazonie.	53
Figure 14. Mouvement des cas de paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> , entre le lieu potentiel de contamination et le lieu de diagnostic au Guyana (A) et en Amazonie (B), 2015-2018.....	54
Figure 15. Nombre de cas de paludisme recensés en Guyane entre 1998 et 2018.....	56
Figure 16. Analyses bayésienne et en composante principale.	59
Figure 17. Prévalence des délétions du gène <i>pfhrp2</i> et <i>pfhrp3</i> sur le plateau des Guyanes, 2014-2018.	62
Figure 18. Prévalence du portage à <i>Plasmodium spp.</i> chez les orpailleurs travaillant en Guyane, 2015.	67
Figure 19. Antonio do Brinco à la frontière entre le Suriname et la Guyane, lieu de distribution de Malakit. ...	69
Figure 20. Quartiers ciblés par les campagnes de dépistage actif (en jaune), PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018.....	71
Figure 21. Prévalence par PCR de <i>Plasmodium spp.</i> , Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018.....	72
Figure 22. Pratiques vis-à-vis du paludisme, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.....	73
Figure 23. Langue maternelle des habitants de l'étude PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.	73
Figure 24. Caractérisation de l'épidémie de paludisme, St Georges de l'Oyapock, 2017.	75
Figure 25. Exhaustivité du recrutement du CNR paludisme (a) et son réseau de partenaires guyanais (b)....	81
Figure 26. Cartographie des collaborateurs du laboratoire de parasitologie en Guyane et à l'international. ...	82
Figure 27. Nombre de projets annuels et montants associés (hors subvention MESR).....	83
Tableau 1. Diversité génétique parasitaire avant et après échec thérapeutique par atovaquone-proguanil. ...	40
Tableau 2. Allèles <i>pfcr</i> t observés en fonction de l'origine géographiques des isolats de <i>P. falciparum</i>	43
Tableau 3. Tableau récapitulatif des perspectives de recherche en cours ou envisagées.	77

Curriculum vitae

Lise Musset

Etat civil

MUSSET Lise
Née le 7 mars 1978 à Reims (51)
Vie maritale, 3 enfants

Docteur en pharmacie Docteur-ès-sciences

Fonctions

- Depuis 2020 **Pharmacienne biologiste réserviste**, Service de santé des Armées – Cayenne.
- Depuis 2017 **Co-coordinatrice du Centre National de Référence du paludisme, Pharmacienne biologiste, responsable**, Pôle Zones endémiques, Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.
- Depuis 2015 **Responsable du Laboratoire de parasitologie** – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.
- Depuis 2014 **Responsable du Centre Collaborateur OMS** pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.
- Depuis 2010 **Personne Compétente en Radioprotection** – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.
- 2012-2016 **Responsable** du CNR Paludisme, laboratoire associé pour la région Antilles-Guyane – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.
- 2010-2014 **Correspondante qualité** norme NF EN ISO 15189 Laboratoire de parasitologie – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.
- 2007-2014 **Responsable adjointe** Laboratoire de parasitologie – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.
- 2006-2007 **Chercheuse associée** (Postdoctorante) – Laboratoire de David Fidock – Department of Microbiology and Medicine – Columbia University – New-York.
"Rôle de la protéine PfCRT dans la résistance de Plasmodium falciparum aux antipaludiques."
- 2000-2006 **Doctorante** – Ecole Doctorale du Médicament – Paris 5.
"Contribution à l'étude de la résistance de Plasmodium falciparum à l'atovaquone-proguanil."
Laboratoire de parasitologie-mycologie : CNR Paludisme / EA 209 Faculté de pharmacie – Paris.
Sous la direction du Pr Jacques Le Bras.

Statut professionnel

- Depuis 2016 **Chargée de recherche expert**, cadre scientifique – Institut Pasteur – Paris.
- 2010-2016 **Chargée de recherche**, cadre scientifique – Institut Pasteur – Paris.
- 2009-2010 **Assistant chargée de recherche**, cadre scientifique – Institut Pasteur – Paris.
- 2007-2009 **Cadre Administratif et Technique** – Institut Pasteur – Paris.

Formation initiale et diplômes

- 2011 **Personne Compétente en Radioprotection** – APAVE – Paris 17.
- 2007 **Post-doctorat** – Laboratoire de David Fidock – Department of Microbiology and Medicine – Columbia University – New-York.
"Rôle de la protéine PfCRT dans la résistance de Plasmodium falciparum aux antipaludiques."
Financement : Bourse Lavoisier du Ministère des Affaires Etrangères.
- 2006 **Doctorat Sciences de la vie** – Ecole Doctorale du Médicament – Paris 5.
"Etude de la résistance à l'atovaquone-proguanil chez Plasmodium falciparum : phénotype, génotype et mécanismes moléculaires impliqués."
Directeur : Pr. Jacques Le Bras.

Laboratoires : CNR Paludisme (Hôpital Bichat-Claude Bernard) – EA 209 "Eucaryotes unicellulaires pathogènes : transports membranaires et chimiorésistance" (Faculté de pharmacie Paris 5).

Financement : Allocation du ministère de la recherche.

Mention : Très Honorable avec félicitations du jury.

- 2003 **DIU du Centre Enseignement de la Statistique Appliquée à la Médecine** – Paris 6.
Option : statistiques appliquées à la biologie.
Mention : Bien.
- 2002 **Thèse d'Etat pour l'obtention du titre de Docteur en pharmacie** – Reims.
"*Plasmodium falciparum*: recherche et étude d'un polymorphisme dans le gène du cytochrome b associé à la résistance in vitro à l'atovaquone."
Mention : Très Honorable avec félicitations du jury.
- 2001 **DEA biologie, génétique et immunologie des infections parasitaires** – Paris 5.
"*Etude de la résistance à l'atovaquone chez Plasmodium falciparum : phénotype, génotype et mécanismes moléculaires impliqués.*"
Directeur : Pr. Jacques Le Bras, Laboratoire : Centre National de Référence du Paludisme.
Rang 3/19, Mention : Bien.
- 2000 **Maîtrise de sciences biologiques et médicales** – Reims.
Composée de cinq certificats: Parasitologie générale et spécialisée (toxoplasmose) ; Physiopathologie des maladies transmissibles (VIH, *P. aeruginosa*, toxoplasmose) ; Biochimie générale (métabolismes et facteurs de transcription) et spécialisée (culture cellulaire).
- 1995 **Baccalauréat scientifique** option SVT – Lycée Félix Eboué – Cayenne.
Mention : assez bien.

Publications scientifiques

[h-index 25](#), ([Google scholar](#))

Tableau de synthèse des publications par positionnement au sein des auteurs et index de citation du journal

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
1^{er}, 2^{ème} auteur		3	1		1					2	1	2	1		1		12
		4,7	9,9		2,6					4,3	2,9	2,9	NR		4,7		
		0,6								2,7		2,7					
		2,8															
Auteur associé						1		3	3	2	6	6	1	1	1	5	29
						8,1		9,4	4,4	6,1	4,4	10,2	3,0	2,7	NR	4,4	
								4,5	3,5	8,2	2,9	7,4	2,5			0,9	
								2,7	4,0		2,9	79,7				0,4	
											2,9	1,5				NR	
											2,9	3,4				ND	
											5,2	6,2					
Avant dernier					1									2		1	4
					NR									2,7		2,6	
Dernier auteur									1		1		1	1		2	6
									4,4		9,7		NR	4,9		2,3	
																7,6	
Total		3	1	0	2	1	0	3	4	4	8	8	5	2	2	8	51

En violet figurent mes publications en premier ou dernier auteur. NR: non référencé en termes de facteur d'impact, ND: non déterminé.

45. Saldanha R, Mosnier E, Barcellos C, Carbanar A, Charron C, Desconnets JC, Guarmit B, Do Socorro Mendonça Gomes M, Mandon T, Martins Mendes A, Peiter PC, **Musset L**, Sanna A, Van Gastel B, Roux E. Contributing to elimination of cross-border malaria through a standardized solution for case surveillance, data sharing, and data interpretation: development of a cross-border monitoring system. *JMIR Public Health Surveill*, 2020;6(3):e15409. doi: [10.2196/15409](https://doi.org/10.2196/15409). PubMed PMID: 32663141.

• Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Saldanha R, Guidez A, Gomes MS, Sanna A, Epelboin Y, Restrepo J, Davy D, Demar M, Djossou F, Douine M, Ardillon V, Nacher M, **Musset L**, Roux E. Resurgence risk for malaria, characterization of a recent outbreak in a Amazonian border area French Guiana/Brazil. *BMC Infect dis*, 2020;20(1):373. doi: [0.1186/s12879-020-05086-4](https://doi.org/10.1186/s12879-020-05086-4). PubMed PMID: 32456698; PMCID: [PMC7249302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7249302/). IF n-1: 2.58

- Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Ade MP, Lucchi NW, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Demar M, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, **Musset L**. Local emergence and clonal propagation in eastern Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. *Elife*, **2020**;9:e51015. doi: [10.7554/eLife.51015](https://doi.org/10.7554/eLife.51015). PubMed PMID: 32394893; PMCID: [PMC7217694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7217694/). *IF n-1*: 7.55.
- Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Acuña Hidalgo B, Durand P, Houze S, Berry A, Zakeri S, Haque R, Shafiul Alam M, Nosten F, Severini C, Gebru Woldearegai T, Mordmüller B, Kremsner PG, González-Cerón L, Fontecha G, Gamboa D, **Musset L**, Legrand E, Noya O, Pumpaibool T, Harnyuttanakorn P, Lekweiry KM, Mohamad Albsheer M, Mahdi Abdel Hamid M, Boukary AOMS, Trape JF, Renaud F, Prugnolle F. Human *Plasmodium vivax* diversity, population structure and evolutionary origin. *PLoS Negl Trop Dis*, **2020**;14(3):e0008072. doi: [10.1371/journal.pntd.0008072](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008072). PubMed PMID: 32150544; PMCID: [PMC7082039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7082039/). *IF n-2*: 4.40.
- Mosnier E, Roux E, Cropet C, Lazrek Y, Moriceau O, Gaillet M, Mathieu L, Nacher M, Demar M, Odonne G, Douine M, Michaud C, Pelleau S, Djossou F, **Musset L**. Prevalence of *Plasmodium* spp. in the Amazonian border context (French Guiana-Brazil): Associated factors and spatial distribution. *Am J Trop Med Hyg*, **2020**;102(1):130-41. doi: [10.4269/ajtmh.19-0378](https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0378). PubMed PMID: 31769403; PMCID: [PMC6947805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6947805/). *IF n-1*: 2.25.
- 40** · **Musset L**, Heugas C, Naldjinar R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Volney B, Walter G, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. Emergence of *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2019**;63(11):e02116-18. doi: [10.1128/AAC.02116-18](https://doi.org/10.1128/AAC.02116-18). PubMed PMID: 31481442; PMCID: [PMC6811453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6811453/). *IF n*: 4.68.
- Kendjo E, Houzé S, Mouri O, Taieb A, Gay F, Jauréguiberry S, Tantaoui I, Ndour PA, Buffet P, Piarroux M, Thellier M, Piarroux R for the French Imported Malaria Study Group. Epidemiologic trends in malaria incidence among travelers returning to metropolitan France, 1996-2016. *JAMA Network Open*, **2019**. 2(4): e191691. doi: [10.1001/jamanetworkopen.2019.1691](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.1691). PubMed PMID: 30951158; PMCID: [PMC6523451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6523451/).
- Douine M, Sanna A, Galindo M, **Musset L**, Pommier de Santi V, Marchesini P, Magalhaes ED, Suarez-Mutis M, Hiwat H, Nacher M, Vreden S, Garancher L. Malakit: an innovative pilot project to self-diagnose and self-treat malaria among illegal gold miners in the Guiana Shield. *Malar J*, **2018**;17(1):158 doi: [10.1186/s12936-018-2306-5](https://doi.org/10.1186/s12936-018-2306-5). PubMed PMID: 29631588; PMCID: [PMC5892004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5892004/). *IF n+2*: 2.71.
- Douine M, Lazrek Y, Blanchet D, Pelleau S, Chanlin R, Corlin F, Hureau L, Volney B, Hiwat H, Vreden S, Djossou F, Demar M, Nacher M, **Musset L**. Predictors of antimalarial self-medication in illegal gold miners in French Guiana: a pathway towards artemisinin resistance. *J Antimicrob Chemother*, **2018**;73(1):231-9. doi: [10.1093/jac/dkx343](https://doi.org/10.1093/jac/dkx343). PubMed PMID: 29045645. *IF n+2*: 4.94.
- Douine M, Mosnier E, Le Hingrat Q, Charpentier C, Corlin F, Hureau L, Adenis A, Lazrek Y, Niemetsky F, Aucouturier AL, Demar M, **Musset L**, Nacher M. Illegal gold miners in French Guiana : a neglected population with poor health. *BMC Public Health*, **2017**;18(1):23. doi: [10.1186/s12889-017-4557-4](https://doi.org/10.1186/s12889-017-4557-4). PubMed PMID: 28716015; PMCID: [PMC5513330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5513330/). *IF n+2*: 2.70.
- 35** · Mosnier E, Douine M, Epelboin L, Pelleau S, Pommier de Santi V, Dangel Y, Demar M, Mutricy R, Guarmit B, Nacher M, Brousse P, Davy D, Djossou F, **Musset L**. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *vivax* infection in the neighborhood of Blondin, Saint-Georges-de-l'Oyapock District, French Guiana. *Bull Soc Pathol Exot*, **2017**;110(4):265-9. doi: [10.1007/s13149-017-0572-z](https://doi.org/10.1007/s13149-017-0572-z). PubMed PMID: 2892395.
- Rougeron V, Tiedje KE, Chen DS, Rask TS, Gamboa D, Maestre A, **Musset L**, Legrand E, Noya O, Yalcindag E, Renaud F, Prugnolle F, Day KP. Evolutionary structure of *Plasmodium falciparum* major surface antigen genes in South America: Implications for epidemic transmission and surveillance. *Ecol Evol*, **2017**;7(22):9376-90. doi: [10.1002/ece3.3425](https://doi.org/10.1002/ece3.3425). PubMed PMID: 29187985; PMCID: [PMC5696401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5696401/). *IF n+2*: 2.54.
- Leba LJ, Popovici J, Estevez Y, Pelleau S, Legrand E, **Musset L**, Duplais C. Antiplasmodial activities of dyes against *Plasmodium falciparum* asexual and sexual stages: Contrasted uptakes of triarylmethanes Brilliant green, Green S (E142), and Patent Blue V (E131) by erythrocytes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **2017**;7(3):314-20. doi: [10.1016/j.ijpddr.2017.07.002](https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.07.002). PubMed PMID: 28886443; PMCID: [PMC5587875](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5587875/). *IF n+1*: 3.02.
- Gabryszewski SJ, Dhingra SK, Combrinck JM, Lewis IA, Callaghan PS, Hassett MR, Siriwardana A, **Musset L**, Smith PJ, Llinás M, Egan TJ, Roepe PD, Fidock DA. Evolution of fitness cost-neutral mutant PfCRT conferring *P. falciparum* 4-aminoquinoline drug resistance is accompanied by altered digestive vacuole physiology and reduced metabolic stress. *PLoS Pathogens*, **2016**;12(11):e1005976. doi: [10.1371/journal.ppat.1005976](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005976). PubMed PMID: 27832198; PMCID: [PMC5104409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5104409/). *IF n+2*: 6.18.
- Faway E, **Musset L**, Pelleau S, Volney B, Casteras J, Caro V, Menard D, Briolant S, Legrand E. *Plasmodium vivax* multidrug resistance-1 gene polymorphism in French Guiana. *Malar J*. **2016**;15(1):540. doi: [10.1186/s12936-016-1595-9](https://doi.org/10.1186/s12936-016-1595-9). PubMed PMID: 27825387; PMCID: [PMC5101641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5101641/). *IF n+2*: 2.71.

- 30- Rahman R, Martin MJ, Persaud S, Ceron N, Kellman D, **Musset L**, Carter KH, Ringwald P. Continued Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to Artemisinin in Guyana, With Absence of Kelch Propeller Domain Mutant Alleles. **2016**. *Open Forum Infect Dis*;3(3):ofw185. doi: [10.1093/ofid/ofw185](https://doi.org/10.1093/ofid/ofw185). PubMed PMID: 27704030; PMCID: [PMC5047421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5047421/). *IF n+3: 3.37*.
- Gomes MD, Vieira JL, Cassiano GC, **Musset L**, Legrand E, Nacher M, Couto VS, Machado RL, Couto AA. Evaluation of circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* to estimate its prevalence in Oiapoque, Amapá state, Brazil, bordering French Guiana. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **2016**;58:72. doi: [10.1590/S1678-9946201658072](https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658072). PubMed PMID: 27680177; PMCID: [PMC5048643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5048643/). *IF n+2: 1.49*.
- Menard D, Nimol K, Beghain J, Adegnika A, Kremsner P, Ramharther M, Fandeur T, Sirima S, Houzé S, Djallé D, Vigan-Womas I, Randrianarivelojosa M, Sutherland C, Leelawong M, Herrera S, Laminou I, Silué K, Cui L, Syafruddin D, Boum Y, Ferreira-da-Cruz MF, Lacerda M, Pradines B, Collet L, Fall B, Tahar R, Toure O, Dieye A, **Musset L**, Kano S, Jiang L, Cao J, Chen JH, Zakeri S, Sattabongkot J, Niaré K, Noedl H, Fuehrer HP, Berry A, Menard S, Eboumbou Moukoko C, Morlais I, Espino FE, Mazarati JB, Na-Bangchang K, Nambozi M, Muhindo Mavoko H, Barnadas C, Wini L, Alemu A, Khan W, Shafiu Alam M, Lin Hua T, Lin Hua T, Jahirul Karim M, Phuc BQ, Lin K, Rahim Awab G, Das Thakur G, Khanthavong M, Sheikh Omar A, Warsame M, Bustos M, Kim S, Eam R, Berne L, Khean C, Chy S, Ken M, Loch K, Canier L, Duru V, **Legrand E**, Stokes B, Straimer J, Witkowski B, Fidock D, Rogier C, Ringwald P, Ariey F, Mercereau-Puijalon O. A worldwide map of *Plasmodium P. falciparum* artemisinin resistance. *New England J Med*, **2016**; 374(25):2453-64. doi: [10.1056/NEJMoa1513137](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513137). PubMed PMID: 27332904; PMCID: [PMC4955562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4955562/). *IF n+2: 79.73*.
- Douine M, **Musset L**, Corlin F, Pelleau S, Pasquier J, Mutricy L, Adenis A, Djossou F, Brousse P, Perotti F, Hiwat H, Vreden S, Demar M, Nacher M. Prevalence of *Plasmodium spp.* in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. *Malar J*, **2016**;15:315. doi: [10.1186/s12936-016-1367-6](https://doi.org/10.1186/s12936-016-1367-6). PubMed PMID: 27277831; PMCID: [PMC4899929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4899929/). *IF n+2: 2.85*.
- Pommier de Santi V, Djossou FC, Barthes N, Bogreau HC, Hyvert G, Nguyen C, Pelleau SC, Legrand E, **Musset L**, Nacher M, Briolant SC. Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. *Emerg Infect Dis*, **2016**;22(5):903-6. doi: [10.3201/eid2205.151957](https://doi.org/10.3201/eid2205.151957). PubMed PMID: 27089004; PMCID: [PMC4861531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4861531/). *IF n+2: 7.42*.
- 25- Gabryszewski SJ, Modchang C, **Musset L**, Chookajorn T, Fidock DA. Combinatorial genetic modeling of *pfprt*-mediated drug resistance evolution in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, **2016**;33(6):1554-70. doi: [10.1093/molbev/msw037](https://doi.org/10.1093/molbev/msw037). PubMed PMID: 26908582; PMCID: [PMC4868112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4868112/). *IF n+2: 10.22*.
- Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, Krishnalall K, Ceron N, **Musset L**, Macedo de Oliveira A, Venkatesan M, Rahman R, Barnwell JW, Udhayakumar V. Independent Emergence of the *Plasmodium Falciparum* Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis*. **2015**. 213: 1472-1475. doi: [10.1093/infdis/jiv752](https://doi.org/10.1093/infdis/jiv752). PubMed PMID: 26690347. *IF n+2: 5.19*.
- Ginouves M, Veron V, **Musset L**, Legrand E, Stefani A, Prevot G, Demar M, Djossou F, Brousse P, Nacher M, Carme B. Frequency and distribution of mixed *Plasmodium falciparum-vivax* infections in French Guiana between 2000 and 2008. *Malar J*. **2015**;14:446. doi: [10.1186/s12936-015-0971-1](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0971-1). PubMed PMID: 26555553; PMCID: [PMC4641342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4641342/). *IF n+2: 2.85*.
- Gomes MS, Vieira JL, Machado RL, Nacher M, Stefani A, **Musset L**, Legrand E, Menezes RA, Júnior AA, Sousa AP, Couto VS, Couto AA. Efficacy in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. *Malar J*. **2015**. 14: 402. doi: [10.1186/s12936-015-0925-7](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0925-7). PubMed PMID: 26453152; PMCID: [PMC4600333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4600333/). *IF n+2: 2.85*.
- Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkmand SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA*, Neafsey DE* & **Musset L**. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: reversal of chloroquine resistance by acquisition of a novel *pfprt* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2015**;112(37):11672-77. doi: [10.1073/pnas.1507142112](https://doi.org/10.1073/pnas.1507142112). PubMed PMID: 26261345; PMCID: [PMC4577156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4577156/). *IF n+2: 9.66*.
- 20- Mura M, Briolant S, Donato D, Volney B, Pelleau S, **Musset L**, Legrand E. Absence of correlation between *ex vivo* susceptibility to doxycycline and *pfteQ-pfmdt* gene polymorphism in French Guiana. *Malar J*, **2015**;14:286. doi: [10.1186/s12936-015-0788-y](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0788-y). PubMed PMID: 26206143; PMCID: [PMC4513625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4513625/). *IF n+2: 2.85*.
- Leba LJ, **Musset L**, Pelleau S, Estevez Y, Birer C, Witkowski B, Menard D, Delves MJ, Legrand E, Duplais C, Popovici J. Use of *Plasmodium falciparum* culture-adapted field isolates for *in vitro* exflagellation-blocking assay. *Malar J*, **2015**;14:234. doi: [10.1186/s12936-015-0752-x](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0752-x). PubMed PMID: 26040313; PMCID: [PMC4464717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4464717/). *IF n+2: 2.85*.
- Galinsky K, Valim C, Salmier A, de Thoisy B, **Musset L**, Legrand E, Faust A, Baniecki ML, Ndiaye D, Daniels RF, Hartl DL, Sabeti PC, Wirth DF, Volkman SK, Neafsey DE. COIL: a methodology for evaluating

malarial complexity of infection using likelihood from single nucleotide polymorphism data. *Malar J*, **2015**;14:4. doi: [10.1186/1475-2875-14-4](https://doi.org/10.1186/1475-2875-14-4). PubMed PMID: 25599890; PMCID: [PMC4417311](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4417311/). IF n+2: 2.85.

· Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky K, Daniels RF, Hamilton E, Ferreira MU, Karunaweera ND, Serre D, Zimmerman PA, Sa JM, Wellems TE, **Musset L**, Legrand E, Melnikov A, Neafsey DE, Volkman SK, Wirth DF, Sabeti PC. Development of a single nucleotide polymorphism barcode to genotype *Plasmodium vivax* infections. *PLoS Negl Trop Dis*, **2015**;9(3):e0003539. doi: [10.1371/journal.pntd.0003539](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003539). PubMed PMID: 25781890; PMCID: [PMC4362761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4362761/). IF n+2: 4.37.

· Khim N, Andrianaranjaka V, Popovici J, Kim S, Ratsimbaoa A, Benedet C, Barnadas C, Durand R, Thellier M, Legrand E, **Musset L**, Menegon M, Severini C, Nour BY, Tichit M, Bouchier C, Mercereau-Puijalon O, Ménard D. Effects of mefloquine use on *Plasmodium vivax* multidrug resistance. *Emerg Infect Dis*, **2014**;20(10):1637-44. doi: [10.3201/eid2010.140411](https://doi.org/10.3201/eid2010.140411). PubMed PMID: 25272023; PMCID: [PMC4193276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4193276/). IF n+2: 8.22.

15· Cottrell G, **Musset L**, Hubert V, Le Bras J, Clain J. Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports. *Antimicrob Agents Chemother*, **2014**;58(8):4504-14. doi: [10.1128/AAC.02550-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02550-13). PubMed PMID: 24867967; PMCID: [PMC4136057](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4136057/). IF n+2: 4.30.

· Yalcindag E, Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Brisse S, Diancourt L, Aubouy A, Becquart P, d'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Maestre A, Menard D, **Musset L**, Noya O, Veron V, Wide A, Carme B, Legrand E, Chevillon C, Ayala F, Renaud F, Prugnolle F. Patterns of selection on *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigens after the colonisation of the New World. *Mol Ecology*, **2014**;23(8):1979-93. doi: [10.1111/mec.12696](https://doi.org/10.1111/mec.12696). PubMed PMID: 24834503. IF n+2: 6.09.

· Menard D, Chan ER, Benedet C, Ratsimbaoa A, Kim S, Chim P, Do C, Witkowski B, Durand R, Thellier M, Severini C, Legrand E, **Musset L**, Nour BY, Mercereau-Puijalon O, Serre D, Zimmerman PA. Whole genome sequencing of field isolates reveals a common duplication of the duffy binding protein gene in Malagasy *Plasmodium vivax* strains. *PLoS Negl Trop Dis*, **2013**;7(11):e2489. doi: [10.1371/journal.pntd.0002489](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002489). PubMed PMID: 24278487; PMCID: [PMC3836732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3836732/). IF n+2: 3.95.

· Trouvay M, Palazon G, Berger F, Volney B, Blanchet D, Faway E, Donato D, Legrand E, Carme B, **Musset L**. High performances of histidine-rich protein 2 based rapid diagnostic tests in French Guiana are explained by the absence of *pfhrp2* gene deletion in *P. falciparum*. *PLoS One*, **2013**;8(9):e74269. doi: [10.1371/journal.pone.0074269](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074269). PubMed PMID: 24086328; PMCID: [PMC3781074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3781074/). IF n+2: 4.41.

· Stefani A, Dusfour I, Corrêa AP, Cruz MC, Dessay N, Galardo AK, Galardo CD, Girod R, Gomes MS, Gurgel H, Lima AC, Moreno ES, **Musset L**, Nacher M, Soares AC, Carme B, Roux E. Land cover, land use and malaria in the Amazon: a systematic literature review of studies using remotely sensed data. *Malaria J*, **2013**;12:192. doi: [10.1186/1475-2875-12-192](https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-192). PubMed PMID: 23758827; PMCID: [PMC3684522](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3684522/). IF n+2: 3.49.

10· Woodrow CJ, Dahlström S, Cooksey R, Flegg JA, Le Nagard H, Mentré F, Murillo C, Ménard D, Nosten F, Sriprawat K, **Musset L**, Quashie NB, Lim P, Fairhurst RM, Nsohya SL, Sinou V, Noedl H, Pradines B, Johnson JD, Guerin PJ, Sibley CH, Le Bras J. High-throughput analysis of antimalarial susceptibility data by the WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) *in vitro* analysis and reporting tool. *Antimicrob Agents Chemother*, **2013**;57(7):3121-30. doi: [10.1128/AAC.02350-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02350-12). PubMed PMID: 23612201; PMCID: [PMC3697366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3697366/). IF n+2: 4.42.

· Berger F, Flamand C, **Musset L**, Djossou F, Rosine J, Sanquer MA, Dusfour I, Legrand E, Ardillon V, Rabarison P, Grenier C, Girod R. Investigation of a sudden malaria outbreak in the isolated Amazonian village of Saül, French Guiana, January-April 2009. *Am J Trop Med Hyg*, **2012**;86(4):591-7. doi: [10.4269/ajtmh.2012.11-0582](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0582). PubMed PMID: 22492141; PMCID: [PMC3403779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3403779/). IF n+2: 2.70.

· Legrand E, Yrinesi J, Ekala MT, Peneau J, Volney B, Berger F, Bouchier C, Bertani S, **Musset L**, Meynard JB, Puijalon O. Discordant temporal evolution of *Pfcr* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium falciparum* *in vitro* drug susceptibility to 4-aminoquinolines after changing drug policy in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2012**;56(3):1382-9. doi: [10.1128/AAC.05280-11](https://doi.org/10.1128/AAC.05280-11). PubMed PMID: 22232280; PMCID: [PMC3294927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3294927/). IF n+2: 4.48.

· Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson T, Aubouy A, Balloux F, Besnard P, Bogreau H, Carnevale P, d'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Jombart T, Le Mire J, Leroy E, Maestrel A, Mayxay M, Ménard D, **Musset L**, Newton PN, Nkoghe D, Noya O, Ollomo B, Rogier C, Veron V, Wide A, Zakeri S, Carme B, Legrand E, Chevillon C, Ayala FJ, Renaud F, Prugnolle F. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *PNAS*, **2012**;109(2):511-6. doi: [10.1073/pnas.1119058109](https://doi.org/10.1073/pnas.1119058109). PubMed PMID: 22203975; PMCID: [PMC3258587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3258587/). IF n+2: 9.42.

- Valderramos S, Valderramos JC, **Musset L**, Purcell L, Mercereau-Puijalon O, Legrand E, Fidock D. Identification of a Mutant PfCRT-Mediated Chloroquine Tolerance Phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLOS Path.* **2010**;6(5):e1000887. doi: [10.1371/journal.ppat.1000887](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000887). PubMed PMID: 20485514; PMCID: [PMC2869323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2869323/). *IF n+2: 8.14*.
- 5**· Berger F, Girod R, Grenier C, Djossou F, Rosine J, Ardillon V, Ruello M, Sanquer MA, Besançon L, **Musset L**, Flamand C. Recrudescence de paludisme à Saül, Guyane, 2008. *BVS Antilles-Guyane*, **2009**;11:2-4.
- Barnadas C, **Musset L**, Legrand E, Tichit M, Briolant S, Fusai T, Rogier C, Bouchier C, Picot S, Ménard D. High prevalence and fixation of *Plasmodium vivax* dhfr/dhps mutations related to sulfadoxine/pyrimethamine resistance in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg*, **2009**;81(1):19-22. doi: [10.4269/ajtmh.2009.81.19](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.19). PubMed PMID: 19556560. *IF n+2: 2.59*.
- **Musset L**, Le Bras J, Clain J. Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol*, **2007**;24(8):1582-5. doi: [10.1093/molbev/msm087](https://doi.org/10.1093/molbev/msm087). PubMed PMID: 17488741. *IF n+2: 9.87*.
- **Musset L**, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. *Microbes Infect*, **2006**;8(11):2599-604. doi: [10.1093/jac/dkx431](https://doi.org/10.1093/jac/dkx431). PubMed PMID: 16962361. *IF n+2: 2.80*.
- 1**· **Musset L**, Pradines B, Parzy D, Durand R, Bigot P, Le Bras J. Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *J Antimicrob Chemother*, **2006**. 57(1):110-5. doi: [10.1093/jac/dki420](https://doi.org/10.1093/jac/dki420). PubMed PMID: 16319183. *IF n+2: 4.716*.

Revues

- Mosnier E, Garancher L, Galindo M, Djossou, FM, Moriceau O, Hureau-Mutricy L, Silva Barbosa R, Lambert Y, Lazrek Y, **Musset L**, Douine M. Paludisme en Guyane : des projets de recherche opérationnelle originaux s'appuyant sur la santé communautaire. *La lettre de l'infectiologue*, **2020**;35(2): 50-7. [Accessible en ligne](#).
- R5**· Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, **2020**;7(2):37-47. doi: [10.1007/s40475-020-00202-5](https://doi.org/10.1007/s40475-020-00202-5). *IF n-2: 0.92*.
- Thellier M, Simard F, **Musset L**, Cot M, Velut G, Kendjo E, Pradines B. Changes in malaria epidemiology in France and worldwide, 2000-2015. *Med Mal Infect*, **2020**;50:99-112. doi: [10.1016/j.medmal.2019.06.002](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.06.002). PubMed PMID: 31257063. *IF n-2: 0.38*.
- Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, **2020**;7(2):37-47. doi: [10.1007/s40475-020-00202-5](https://doi.org/10.1007/s40475-020-00202-5). *IF n-2: 0.92*.
- **Musset L**, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, Gomes MSM, Djossou F, Legrand E. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2014**;109(5):525-33. doi: [10.1590/0074-0276140031](https://doi.org/10.1590/0074-0276140031). PubMed PMID: 25184998; PMCID: [PMC4156445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4156445/). *IF n+2: 2.67*.
- R1**· Le Bras J, **Musset L**, Clain J. [Antimalarial drug resistance]. *Med Mal Infect*, **2006**;36(8):401-5. Epub 2006/07/21. doi: [10.1016/j.medmal.2006.05.005](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.05.005). PubMed PMID: 16854546. *IF n+2: 0.62*.

Activités d'expertise

Auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et Organisation Panaméricaine de la santé (OPS)

- **2019**. 68th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, November 20-24th, National Harbor (USA). Conference title: A PAHO/WHO collaborating center perspective: efforts and partnerships to control and interpret laboratory-based drug resistance information to support malaria elimination.
- **2019**. *Evolving artemisinin resistance workshop*, 17-19th November, Washington DC (USA).
- **2019**. *Regional meeting on malaria in mobile migrant populations*, 29-31st October, Paramaribo (Suriname).
- **2019**. *Meeting on malaria elimination in South America*, 12-14th August, Manaus (Brazil). Invited conference: Results of the support of the Collaborating Centers.
- **2019**. *Supervisory visit, therapeutic efficacy study*, 9-11th April, Georgetown and Port Kaituma (Guyana).

- **2018.** *Malaria project managers' meeting*, 14-16th November, Washington DC (USA). Invited conference: Situation of global resistance to antimalarials in the region.
- **2017.** *Meeting on malaria elimination of P. falciparum malaria: detection, treatment, and surveillance of cases*, 16-18th May, Lima (Peru). Invited conference: Situation of artemisinin resistance in Guyana: update from the *pfk13* gene as a molecular marker.
- **2016.** *Technical consultations on WHO prequalification requirements for in vitro diagnostics (IVDs) to detect G6PD deficiency*. 26-28th September, Geneva (Switzerland).
- **2016.** *Guyana Shield meeting on the implementation of the framework for artemisinin resistance prevention, containment, and elimination in South America*. 12-14th July, Paramaribo (Suriname).
- **2016.** *XV Reunión Anual de Evaluación de AMI/RAVREDA*, 3-5th May, Bogota (Colombia). Invited conference: Molecular marker and resistance surveillance in South America: inputs from WHO CC form surveillance of antimalarial drug resistance.
- **2015.** *Inaugural Meeting of the Malaria Technical Advisory Group of PAHO*, 8-9th October, Punta Cana (Dominican Republic). Observer.
- **2015.** *PAHO Regional Consultation Meeting on the Strategy and Plan of Action for Malaria in the Americas 2016-2020*, 6-7th March, Punta Cana (Dominican Republic). One invited conference: Malaria resistance surveillance on the Guiana Shield.
- **2015.** *XIV Reunión Anual de Evaluación de AMI/RAVREDA*, 24-26th March, Rio de Janeiro (Brésil). Invited conference: Current situation of resistance to antimalarial drugs in Amazonia: Past and current drugs.
- **2015.** *PAHO Regional Technical Review Panel (TRP) for Global Fund Malaria Concept Notes*, 17-19th March, Washington DC (USA). Musset L.: Review of the Concept note for Haiti.
- **2014.** *PAHO Meeting for the Guiana Shield and Regional consultation of the action plan for the containment and elimination of resistance to artemisinin derivatives in South America*, 11-13 novembre, Paramaribo (Suriname). Two invited conferences: i) Monitoring antimalarial therapeutic efficacy: issues, challenges and strategic approaches. ii) Drug efficacy and resistance level of artemisinin derivatives and partner drugs in French Guiana.
- **2014.** *PAHO Technical Consultation on Plasmodium vivax in the Americas*, 5th March, Panama city (Panama).
- **2014.** *PAHO/AMRO Consultation on the Global Malaria Action Plan 2016-2025 (GMAP 2)*, 3-4th March, Panama city (Panama).
- **2014.** *PAHO/AMRO Regional Consultation on the Global Technical Strategy 2016-2025 (GTS)*, 1-2nd March, Panama city (Panama).
- **2014.** *XIII Reunión Anual de Evaluación de AMI/RAVREDA*, 11-13th March, Managua (Nicaragua). One invited conference: Malaria resistance monitoring.
- **2013.** *Malaria Research Agenda, PAHO meeting*, 11-12 novembre, Washington (USA). One presentation: Knowledge building effort in French Guiana.
- **2012.** *XI Reunión Anual de Evaluación de AMI/RAVREDA*, 19-23th March, Antigua (Guatemala).
- **2010.** *Séminaire de coopération technique pour la prévention du paludisme*, 7-9 juin, Cayenne (Guyane). Two invited conferences: i) Chimiorésistance *in vitro* de *Plasmodium falciparum* en Guyane ; ii) Evaluation des TDR en Guyane.

Auprès de l'Agence Région de Santé de Guyane

- **2019.** Elaboration *Plan régional de lutte contre le paludisme 2019-2025*.
- **2018.** *Comité de suivi du plan de lutte contre le paludisme en Guyane*, 13 septembre, Cayenne. CNR Paludisme/CC OMS : activités de recherche au service de la santé publique guyanaise.
- **2017.** *Rencontre d'échanges, Plan de lutte contre le paludisme en Guyane*, 7 mars, Cayenne. Laboratoire de parasitologie : activités, résultats et perspectives dans le cadre de la lutte contre le paludisme.
- **2017.** *CEMCE*, 10 février, Cayenne. Le plateau des Guyanes est-il la prochaine région d'émergence de la résistance aux artémisinines?
- **2014-2015.** *Plan régional de lutte contre le paludisme 2015-2018*. Coordination des groupes d'experts sur les questions du diagnostic et de la prise en charge. Participation aux groupes s'intéressant au diagnostic et à l'épidémiologie.

Auprès du Haut Conseil de la Santé Publique

- **2019.** Audition auprès du groupe de travail visant à évaluer l'état de la santé en Guyane.

- **2018.** Participation au groupe de travail visant à évaluer l'intérêt de l'utilisation de la primaquine à visée « altruiste » contre *Plasmodium falciparum* dans les zones de forêt à l'intérieur de la Guyane et à visée anti-hypnozoitaire contre *P. vivax* en France en général.

Auprès de SPILF

- **2017.** Mise à jour des recommandations de prise en charge et prévention du paludisme d'importation en France continentale. Participation au groupe de travail sur l'épidémiologie.

Membre de comité scientifique

- **Depuis 2017.** Conseil scientifique du Labex CEBA, Centre d'Etude pour la Biodiversité Amazonienne. Coordination : Jérôme Chave, CNRS Guyane.
- **2014-2016.** Comité scientifique du projet ORPAL, prévalence du portage de Plasmodium chez les personnes travaillant sur les sites d'orpaillage clandestin en Guyane française. Coordination : Dr Maylis Douine, CIC Guyane.
- **2014-2015.** Comité scientifique du projet KARMA, K-13 Artemisinin Resistance Multicentre rapid Assessment. Coordination : D. Ménard, IP Cambodge.
- **2010-2011.** Comité scientifique groupe *in vitro* du réseau WorldWide Antimalarial Resistance Network (Bill & Melinda Gates Fondation).

Expertise d'articles

- **Depuis 2010.** Référé pour les journaux internationaux (entre autres) : Clinical Infectious Disease, Acta Tropica, Malaria Journal, PLOS NTD, AAC....

Autres sollicitations

- **2014.** *Paludisme à Plasmodium falciparum : place des dérivés de l'artémisinine.* Expertise et relecture avisée pour ce numéro spécial des Dossiers du CNHIM (Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament). Décembre 2014, XXXV, 6.

Organisation de conférences

- **2020.** 1^{ères} journées guyanaises d'infectiologie, Février, Cayenne (Guyane).
- **2020.** *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 28 janvier, Paris. Trois présentations : i) Le paludisme en Guyane, vers l'élimination ?, ii) PALUSTOP : bilan chiffré et outils d'éducation à la population, perspectives en milieu scolaire, iii) Echecs de l'Eurartesim[®] en Guyane : caractérisation et impact.
- **2019.** CoChair. Antimalarial Efficacy Monitoring in the Americas: The Way Forward As We Move Towards Elimination. *68th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, November 20-24th, National Harbor (USA).
- **2018.** CoChair. How to monitor drug resistance and assess the spread of resistant populations? *Combating resistance! Microbes and vectors*, November 15-16th, Paris (France).
- **2018.** CoChair. Scientific session 20 Malaria chemotherapy and drug resistance, *67th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, October 25th to November 1st, New Orleans (USA).
- **2018.** *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 19 décembre, Paris. Trois présentations : i) Le paludisme sud-américain : contexte, situation épidémiologique et recherche opérationnelle, ii) Malakit : une étude pilote innovante face à la situation complexe de la transmission du paludisme sur les sites d'orpaillage, iii) REAGIR face à la résistance aux ACTs sur le plateau des Guyanes, acte 1 : résistance à l'artémisinine au Guyana.
- **2017.** CoChair. Late breakers turbo talks. *6th International Conference of Plasmodium vivax research*, 11-14th June, Manaus (Brazil).
- **2016.** *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris. Le plateau des Guyanes est-il la prochaine région d'émergence de la résistance aux artémisinines? ; ii) Efficacité thérapeutique de la chloroquine en Guyane 2009 - 2015
- **2014.** Malaria transmission and treatment ; Monitoring malaria resistance. *Amazonian Conference on Emerging and Infectious Diseases*, 26th-28th September 2014, Cayenne (Guyane).
- **2014.** *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 18 décembre, Paris. Deux présentations : i) Evolution de la résistance de *P. falciparum* en zone de faible transmission : réversion de la résistance à la chloroquine par acquisition d'une nouvelle mutation ; ii) Laboratoire associé Antilles-Guyane : Données 2013 et activités 2014.
- **2013.** *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 17 décembre, Paris (France). Trois présentations : i) Paludisme aux Antilles-Guyane : données 2012, tendances 2013 ; ii) Phénotypage vis-à-vis des dérivés de

l'artémisinine : présentation du test RSA ; iii) Traitement par primaquine en Amérique du Sud : recommandations OMS et pratiques.

• **2012.** *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris (France). Une présentation : Paludisme aux Antilles-Guyane : données 2011, tendances 2012.

Transmission de savoirs - Formation à la recherche

Diffusion de savoir auprès des étudiants

Tableau de synthèse des encadrements effectués

	2005	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Post-doctorant						1						1	1	3
Thèse de sciences										1*				1
Thèse d'exercice								1	1					2
Master	1			1	2		1	1-1*		1*	1*	1*	1	11
Ingénieur		1	1					1*	1*					4
Licence			2	1			1		1			1		6
BTS								1*	1*	1*		1*		4
Collégiens											1	1		2
Total	1	1	3	2	2	1	2	5	4	3	2	5	2	33

*co-encadrement

Post-doctorant

. Mme Célia Florimond. *Résistance de P. falciparum à la pipéraquline: émergence et dispersion sur le plateau des Guyanes*. Septembre 2019 – Décembre **2021**.

. Mme Arielle Salmier. *Diversité génétique et dynamique de P. vivax en Guyane : évolution depuis 10 ans et impact des épidémies*. Janvier – Octobre **2019**.

. M Stéphane Pelleau. *Résistance de P. falciparum aux lysosomotropes, dynamique et évolution des plasmodies au cours du temps*. Juin **2012** – Octobre **2014**.

Thèse de sciences

. Mme Luana Mathieu. Université de Guyane, Doctorante. *Résistances de P. falciparum aux associations à base de dérivés de l'artémisinine : caractérisation et épidémiologie sur le plateau des Guyanes*. Janvier **2017** - Décembre **2020**. Co-encadrée par Lise Musset et Pr Magalie Demar.

Thèse d'exercice, mémoires de DES, Internes en biologie médicale

. Mme Léna Berthelot. DES de biologie médicale, thèse d'exercice de médecine. Université des Antilles-Guyane, 7^{ème} semestre. *Prévalence des délétions des gènes pfhrp2 et pfhrp3 chez Plasmodium falciparum sur le plateau des Guyanes*. Novembre **2016** - Avril **2017**. Six mois. Soutenance de thèse d'exercice en médecine et mémoire de DES de biologie médicale : 23 avril 2018 Université des Antilles.

. M Christophe Heugas. DES de biologie médicale, thèse d'exercice de médecine. Université de Poitiers, 6^{ème} semestre. *Evaluation de l'efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement de P. vivax en Guyane*. Novembre **2015** - Avril **2016**. Six mois. Soutenance de thèse d'exercice en médecine et mémoire de DES de biologie médicale : 20 septembre 2016 Université de Poitiers.

Master – Etudiants en pharmacie

. Mme Solène Blin. 5^{ème} année de médecine, Université Paris-Sud. *Evaluation du lien génotype/phénotype G6PD*. Septembre à Décembre **2020**. Quatre mois. Co-encadrée par Lise Musset et Yassamine Lazrek.

. Mme Swaelie Sauthier. Année d'industrie, MSci Biomedical Science, York University, United Kingdom. *Malaria in French Guiana: transmission and treatment*. Septembre **2018** à Juin **2019**. Dix mois.

. M Maxime Agranier. 3^{ème} année de Pharmacie, master 2 de microbiologie-infectiologie, pharma-science. Université Paris Descartes. *Validation des gènes de la plasmepsine II et de la plasmepsine III comme marqueurs moléculaires de résistance à la pipéraquline de Plasmodium falciparum en Guyane*. Juillet - Septembre **2018**. Trois mois. Co-encadré par Lise Musset et Yassamine Lazrek.

. Mme Adeline Mallard. Pédiatre, étudiante en master 2 de santé publique en e-learning. ISPED, Université de Bordeaux. *Connaissances, attitudes et pratiques vis-à-vis du paludisme dans les populations autochtones du*

bassin du bas Oyapock en Guyane. Mars - Juin **2017**. Quatre mois. Co-encadrée par Lise Musset et Emilie Mosnier.

. Mme Luana Mathieu. Université de Bordeaux, Master 2 Microbiologie et immunologie. *Mutations au niveau du gène pfk13 et résistance de P. falciparum aux dérivés de l'artémisinine dans le bassin amazonien*. Décembre **2015** - Mai **2016**. Six mois.

. Mme Nadia Sadok. Université de Rennes 1, Master 2. *Analyse du fitness des souches de P. falciparum porteuses d'un nouvel allèle du gène pfcr1 lié à la réversion de la chloroquino-résistance*. Janvier-Mai **2015**. Six mois. Co-encadrée par Stéphane Pelleau et Lise Musset.

. Mme Vicencia Davito. Faculté de pharmacie de Limoges, Master 2 recherche Zoonoses et environnement. *Analyse de la diversité génétique autour du gène pfcr1 de Plasmodium falciparum associé à la résistance à la chloroquine en Guyane*. Janvier-Mai **2013**. Six mois. Co-encadrée par Stéphane Pelleau et Lise Musset.

. Mme Mélanie Trouvay. Institut de santé publique, d'épidémiologie et de développement Bordeaux 2, Master 2 santé publique internationale option contrôle et surveillance des pathologies tropicales. *Etude de la sensibilité des tests de diagnostic rapide du paludisme en Guyane*. Avril-Août **2011**. Quatre mois.

. Mme Zoé Boulard. Université Paris 6, Master 1 Biologie cellulaire et moléculaire. *Comparaison phénotype in vitro à la chloroquine et génotype pfcr1 de P. falciparum en Guyane*. Février-Avril **2011**. Deux mois.

. Mme Arielle Salmier. Faculté des sciences et techniques de Limoges, Master 2 Neuroépidémiologie et parasitologie tropicale. *Etude de la diversité génétique de P. vivax en Guyane*. Décembre-Mai **2010**. Six mois.

. M Martin Moune. CNR Paludisme Paris, Maîtrise. *Initiation à la recherche, aux critiques d'articles et à la rédaction d'un rapport de stage*. Janvier - Mars **2005**. Deux mois.

Ingénieur

. Mme Stessie Reine-Adelaïde. Ecole d'Ingénieur du CESI, St Nazaire, 3^{ème} année. *Analyse du génotype du gène P14 en lien avec la résistance à la pipéraquline chez P. falciparum en Guyane*. Juin **2016**. Cinq semaines. Co-encadrée par Lise Musset et Yassamine Lazrek.

. Mme Célia Rahman. Ecole d'Ingénieur du CESI, Mont St Aignan, 3^{ème} année. *Analyse du génotype du gène P14 en lien avec la résistance à la pipéraquline chez P. falciparum en Guyane*. Septembre-Octobre **2015**. Deux mois. Co-encadrée par Yassamine Lazrek et Lise Musset.

. Mme Anaïs Leroy. Ecole d'Ingénieur de Biologie Industrielle 2^{ème} année secteur qualité. *Mise en place du système documentaire qualité du laboratoire*. Juillet-Août **2009**. Deux mois.

. Mme Anne-Sophie Parant. 2^{ème} année d'Ecole d'Ingénieur de Biologie Industrielle secteur recherche. *Mise au point du typage moléculaire de P. falciparum*. Juillet-Août **2008**. Deux mois.

Licence

. Mme Andréa Duclos. Université de Sheerbrooke (Canada), 2^{ème} année de licence. *Génotypage de la G6PD et de ses variants*. Septembre - Décembre **2019**. Quatre mois.

. M Stéphane Alibar. Université de Guyane, Licence 2. *Analyse du génotype du gène P14 en lien avec la résistance à la pipéraquline chez P. falciparum en Guyane*. Mai **2016**. Cinq semaines. Encadré par Lise Musset et Yassamine Lazrek.

. Mme Leïla Bellony. Université de Picardie Jules Verne, Licence Biologie humaine 3^{ème} année. *Stage d'observation*. Avril-Mai **2013**. Un mois.

. M. Frantz Paul. Université des Antilles et de la Guyane, Licence 3 Biologie, géologie, santé parcours, biochimie et biotechnologie. *Etude de la diversité génétique des isolats de P. falciparum collectés durant l'épidémie de Saül de 2008*. Avril **2010**.

. Mme Leïla Withnel. Université des Antilles et de la Guyane, Licence 3 Biochimie et Biotechnologie. *Optimisation du milieu de culture utilisé pour la multiplication in vitro de P. falciparum*. Avril **2009**. Un mois.

. Mme Lindsay Gamer. Université des Antilles et de la Guyane, Licence 3 Biologie et Sciences de la Santé. Février **2009**. Un mois.

BTS – Stagiaires européens ERASMUS

. M Piet Wubbenhorst. Université de Berlin, Technicien en stage ERASMUS. *Découvertes des techniques de diagnostic et de génotypage des plasmodies*. Février - Mai **2019**. Quatre mois. Co-encadré par Lise Musset et Béatrice Volney.

. Mme Maeva Nodin. Etudiante en 1^{ère} année de BTS Analyses de Biologie Médicale. Lycée Jean Monnet, Franconville. *Découverte des techniques de laboratoire*. Mai - Juin **2017**. Sept semaines. Co-encadrée par Lise Musset et Béatrice Volney.

. M Marco Klein. Université de Nurnberg, Technicien en stage ERASMUS. *Découvertes des techniques de phénotypage et de génotypage des plasmodies*. Février-Mai **2016**. Quatre mois. Co-encadré par Lise Musset et Béatrice Volney.

. Mme Samira Dorante. DUT Génie biologique, IUT Lyon 1. *Paludisme en Guyane : Evaluation du portage de parasites chez les orpailleurs*. Juin **2015**. Quatre semaines. Co-encadrée par Béatrice Volney et Lise Musset.

Collégiens

. Mlle Euriel Lacoste. Stage découverte entreprise 3^{ème}, Collège Gérard Holder, Cayenne. Découverte du monde du travail dans le domaine de la recherche et de la santé publique. Janvier **2019**. Une semaine.

. Mme Pauline Igue. Stage découverte entreprise 3^{ème}, Collège Ste Thérèse, Rémire-Montjoly. Découverte du monde du travail dans le domaine de la recherche et de la santé publique. Novembre **2018**. Une semaine.

Diffusion de savoir auprès des professionnels de santé

. **Depuis 2008**. Dans un premier temps de manière à augmenter puis à maintenir le niveau d'activité du CNR paludisme, j'ai construit et animé un **réseau de partenaires** en Guyane et aux Antilles. La sensibilisation est constante. Au cours de ces missions, une présentation des missions du CNR, des actualités et des résultats dans la zone est effectuée. Dans ce cadre j'organise et élabore annuellement une **rétro-information** pour les partenaires sous forme de bulletin qui a pour objectif de présenter (i) le niveau de participation de chaque partenaire afin d'améliorer la représentativité des échantillons reçus, (ii) le niveau de résistance des plasmodies, (iii) les résultats des actions et projets menés par le Pôle Zones endémiques du CNR Paludisme.

. **2020**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 28 janvier, Paris. Trois présentations : i) Le paludisme en Guyane, vers l'élimination ?, ii) PALUSTOP : bilan chiffré et outils d'éducation à la population, perspectives en milieu scolaire, iii) Echecs de l'Eurartesim[®] en Guyane : caractérisation et impact.

. **2018**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 19 décembre, Paris. Trois présentations : i) Le paludisme sud-américain : contexte, situation épidémiologique et recherche opérationnelle, ii) Malakit : une étude pilote innovante face à la situation complexe de la transmission du paludisme sur les sites d'orpillage, iii) REAGIR face à la résistance aux ACTs sur le plateau des Guyanes, acte 1 : résistance à l'artémisinine au Guyana.

. **2016**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris. Le plateau des Guyanes est-il la prochaine région d'émergence de la résistance aux artémisinines ? ; ii) Efficacité thérapeutique de la chloroquine en Guyane 2009 - 2015

. **2014**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 18 décembre, Paris. Deux présentations : i) Evolution de la résistance de *P. falciparum* en zone de faible transmission : réversion de la résistance à la chloroquine par acquisition d'une nouvelle mutation ; ii) Laboratoire associé Antilles-Guyane : Données 2013 et activités 2014.

. **2013**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 17 décembre, Paris (France). Trois présentations : i) Paludisme aux Antilles-Guyane : données 2012, tendances 2013 ; ii) Phénotypage vis-à-vis des dérivés de l'artémisinine : présentation du test RSA ; iii) Traitement par primaquine en Amérique du Sud : recommandations OMS et pratiques.

. **2012**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris (France). Une présentation : Paludisme aux Antilles-Guyane : données 2011, tendances 2012.

Activités pédagogiques et d'enseignements, diffusion grand public

. Depuis 2019 **Formation d'enseignants** de Sciences de la Vie et de la Terre du secondaire au paludisme en Guyane, à la résistance. Elaboration de séquences pédagogiques. Coordination : Inspectrice régionale en SVT.

. Depuis 2007 Intervention de **sensibilisation en milieu scolaire écoles/collèges/lycées** au paludisme et aux messages de santé publique. Etablissements de Guyane essentiellement situés en zone d'endémie. Elaboration d'outils pédagogiques de diffusion du savoir et d'éducation à la santé. Participation à la **fête de science** pour faire découvrir ce qu'est le paludisme et comment s'en protéger.

. 2016 **Séminaire Laveran Deane** à destination des doctorants brésiliens travaillant sur la thématique du paludisme. Une semaine de travail et d'échanges autour de leur sujet de thèse et présentation de mes travaux en tant que chercheuse, Mangaratiba, Brésil (coordination : C. Tadeu-Ribeiro).

. 2015 **Enseignement post-universitaire**, Cayenne et St Laurent du Maroni. Menaces d'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine dans la région.

- Formations technique** : RSA et multiplication parasitaire des partenaires surinamaises, Cayenne.
- 2010-2012 Cours sur les mécanismes de résistance des plasmodies dans le cadre du **DU de Pathologies Tropicales** de l'Université Antilles-Guyane (coordination : Pr B. Carme).
 - 2005 **Travaux dirigés niveau maîtrise** à l'Université Paris Descartes (70 heures) – Paris.

Financements obtenus

- 2018 [Pertinence des tests de diagnostic rapide sur le plateau des Guyanes, caractérisation de *pfk13* dans la même zone \(WHO\)](#)
Coordinatrice : L. Musset. Montant : **39 300€** (46,227\$). 12/2018 - 12/2020.
- 2018 [La science au service de la population : en route vers l'élimination du paludisme en Guyane \(Rotary\)](#)
Coordinatrice : L. Musset. Montant : **79 922€**. 09/2018 - 08/2019.
- 2017 [ELIMALAR : Elimination du paludisme en Guyane, évaluation des approches et des outils les plus pertinents \(FEDER, ARS\)](#)
Coordinatrice : L. Musset. Montant global du projet : **1 158 698€** Montant du financement accordé : **585 638€** par les fonds européens FEDER et **95 000€** par l'ARS Guyane. 06/2017 - 05/2020.
- 2017 [CNR Paludisme \(SPF\)](#)
Coordinatrice : S. Houzé. Coordination adjointe et responsable Pôle Zones endémique : L. Musset. Financement annuel IPG sur cinq ans : **215 000€**. 01/2017 – 12/2021.
- 2015 [Malaria resistance, malaria resistance to the current recommended drugs in the Amazon region: a multicentric study to enlighten malaria control programs \(Guyamazon III\)](#)
Coordinateurs : L. Musset, M Lacerda. Montant : **92 720€**. 09/2015 - 12/2018.
- 2014 [Caractérisation de la résistance aux artémisinines au Guyana \(WHO\)](#)
Point focal : L. Musset. Montant : **15 946€**. 12/2014 - 12/2018.
- 2014 [Amélioration de la prise en charge du paludisme, évaluation des tests rapides, évaluation des tests TDR paludisme et G6PD \(ARS\)](#)
Coordinatrice : L. Musset. Montant : **65 000€**. 04/2014 - 12/2019.
- 2014 [PlasmoDynEvol, valeur adaptative d'un nouveau marqueur de sensibilité à la chloroquine en Amazonie \(Labex CEBA\)](#)
Coordinateurs : L. Musset, S. Pelleau. Montant : **18 430€**. 04/2014 - 03/2015.
- 2013 [ACIP Substances naturelles A10/2013, activité des substances naturelles amazoniennes sur le blocage de la transmission de *P. falciparum* \(RIIP\)](#)
Coordinateur : E. Legrand. Partenaire : L. Musset. Part IPG : **24 300€**. 09/2013 - 08/2014.
- 2013 [Oemarquine, origine et évolution des marqueurs de résistance à la chloroquine de *P. falciparum* en Guyane \(Labex CEBA\)](#)
Coordinatrice : L. Musset. Montant : **11 600€**. 07/2013 - 12/2014.
- 2013 [Amazomics, étude des facteurs génétiques associés à l'évolution adaptative en général avec un volet *Plasmodium* \(Labex CEBA\)](#)
Coordinateur : B. de Thoisy. Coordinateurs volet *Plasmodium* : L Musset, S. Pelleau. Part IPG : **35 002€**. 05/2013 - 04/2015.
- 2012 [ACIP Artémisinine A14/2012, étude *in vitro* de la résistance aux dérivés de l'artémisinine \(RIIP\)](#)
Coordinateur : B. Witkowski. Responsable local : L Musset, E Legrand. Part IPG : **6 600€**. 09/2012 - 08/2014.
- 2012 [CNR Paludisme \(InVS\)](#)
Coordinateur : S. Houzé. Responsable Pôle Antilles-Guyane : L. Musset. Part IPG : **182 467€** annuels. 01/2012 - 12/2016.
- 2011 [STRonGer \(Fonds Européens FP7\)](#)
Coordinateur : P. Quénel. Co-leader WP2, « Rénovation des locaux et construction d'un insectarium de niveau 3 » : Lise Musset. Montant total : **3 726 156€**, part WP2 : 1 567 487€. 11/2011 - 10/2014.

- 2011 [ACIP Gamétocytes A06/2011, établissement d'une collection de référence d'isolats de *Plasmodium falciparum* produisant des gamétocytes \(RIIP\)](#)
Coordinateur : J. Popovici. Partenaire : L Musset. Part IPG : **6 000€**. 10/2011 - 09/2013.
- 2011 [ACIP Culture, adaptation de *P. falciparum* in vitro \(RIIP\)](#)
Coordinateur : D. Ménard. Responsable local : L Musset. Part IPG : **9 000€**. 08/2011 - 07/2012.
- 2011 [PRAOYA, adaptation de *P. falciparum* in vitro \(FCR\)](#)
Coordinatrice : L Musset. Part IPG : **23 960€**. 02/2011 - 01/2014.
- 2009 [Evaluation de l'activité antipaludique nouveaux antipaludiques \(MMV\)](#)
Coordinateur : B. Pradines. Partenaire : L. Musset. Part IPG : **10 000€**. 01/2009 - 12/2009.

Participation aux jurys de concours

- 2012 Assistant ingénieur interne, BAP J, Assistant en techniques biologiques
Adjoint technique principal 2^{ème} classe externe et interne, BAP A, Préparateur en SVT et biotechnologies

Société savante et organisation professionnelle

- Depuis 2019 Conseillère ordinale, collège biologie, Section E, Guyane
- Depuis 2014 Membre de la Société Américaine de Médecine Tropicale et d'Hygiène.

Communications scientifiques (hors expertise)

Tableau de synthèse des communications scientifiques

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Orales																		
Internationales	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1	1	1	1			2 (2)	2	2 (2)	2 (1)	1	1 (1)	1 (1)	1	21 (12)
Orales nationales		1 (1)		1	1		3				2		1 (1)	1	6 (1)			16 (3)
Affichées																		
Internationales		1 (1)	1			1		1 (1)	2 (2)	2	2	2	1	2 (1)	3	4		22 (5)
Nationales	1 (1)	1 (1)				1	1		1				4		1			10 (2)
Total	3	5	2	2	2	3	5	1	3	4	6	4	8	4	11	5	1	69
Que j'ai présenté	3	5	2					1	2	2		2	2	1	2	1		22

Entre parenthèse figure le nombre de communications que j'ai moi-même présenté.

Communications orales internationales

- Mosnier E, Djossou F, Priam R, Demar M, Epelboin L, Douine M, Nacher M, Carbanar A, Gaillet M, Landlier J, Lazrek Y, **Musset L**. **2020**. Mass PCR testing and targeted treatment for malaria in a low transmission area in Amazonia, French Guiana. *30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18-24th April, Paris (France).
- Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Restrep J, Guidez A, Epelboin Y, Sanna A, Michaud C, Djossou F, Ardillon V, Davy D, Douine M, **Musset L**, Roux E. **2019**. Resurgence risk for malaria: characterization of a recent outbreak of *Plasmodium vivax* in a border area French Guiana-Brazil, 2017. *7th International Conference of Plasmodium vivax research*, 26-28th June, Paris (France).
- **Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houzé P, Abboud P, Volney B, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. **2018**. Emergence of *P. vivax* resistance to chloroquine in French Guiana. *Combating resistance! Microbes and vectors*, November 15-16th, Paris (France).
- Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Lucchi NW, Ade MP, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, **Musset L**. **2018**. *In vitro* artemisinin resistance and the *pfk13* C580Y mutation in Guyana: a confirmed link and emergence. Abst n°71. *67th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, October 25th to November 1st, New Orleans (USA).
- Cerqueira GC, Pelleau S, Melnikov A, Schaffner SF, Volney B, Cheeseman IH, Lazrek Y, Djossou F, McDew-White M, Nair S, Phyo AP, Ashley EA, Anderson TJ, Legrand E, Nosten F, Birren B, **Musset L**, Neafsey DE. **2017**. Comparative longitudinal population genomic surveys of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in French Guiana and Thailand. Abst n° 1365. *66rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 5-9th November, Baltimore (USA).

- **Musset L. 2016.** Malaria resistance to the current recommended drugs in the Amazon region: a multicentric study to enlighten malaria control programs. *Guyamazon program*, 14th June, Belem (Brazil). Conférence invitée.
- Gabryzweski S, Lee MCS, Straimer J, Ng C, Gnadig N, Veiga MI, Dhingra S, Modchang C, Lee A, Vanaerschot M, Ross L, **Pelleau S**, Witkowski B, **Musset L**, Chookajorn T, Menard D, **Fidock DA. 2016.** Leveraging Genome Editing to Define the Genetic Basis of Antimalarial Drug Resistance. *Keystone malaria symposia : Drug Discovery for Parasitic Diseases*, 24-28th January, Tahoe City (USA).
- **Musset L. 2015.** Guiana Shield – The next frontier for artémisinine resistance Pf?. *Abst n°1241. 64th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 25-29th October, Philadelphia (USA). Conférence invitée.
- **Musset L. 2015.** PfCRT and reemergence of chloroquine sensitive *P. falciparum*. *XIV Reunião Nacional de Pesquisa em Malária*, 30 septembre au 3 octobre, Sao Paulo (Brésil). Conférence invitée.
- **Pelleau S**, Moss EL, Dhingra S, **Volney B**, **Casteras J**, Volkman SK, Wirth DF, **Legrand E**, Fidock DA, Neafsey DE, **Musset L. 2014.** Reversal of chloroquine resistance in *P. falciparum* in French Guiana: an original evolutionary pathway from low endemic settings and implications for resistance surveillance in South America. *Abst n°1241. 63rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 2-6th November, New-Orleans (USA).
- **Pelleau S**, Moss EL, Dhingra S, **Volney B**, **Casteras J**, Volkman SK, Wirth DF, **Legrand E**, Fidock DA, Neafsey DE, **Musset L. 2014.** Malaria parasites in low-endemic settings: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of novel mutations. *Scientific symposium of the Institut Pasteur International Network*, 8-14 September, Paris (France).
- **Musset L. 2013.** Malaria in French Guiana: Overview and public health activities. *XIII Reuniao Nacional de Pesquisa em Malária*, 20-23 novembre, Manaus (Brazil). Conférence invitée.
- **Musset L. 2013.** Malaria in French Guiana: challenges and research questions to fight malaria. *Microbial Genomic Group meeting*, 07 novembre, Boston (USA). Conférence invitée.
- **Prugnotte F**, Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson JA, Aubouy A, Balloux F, Besnard P, Bogreau P, Carnevale P, D'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Jombart T, Le Mire J, Leroy E, Maestre Buitrago A, Mayxay M, Ménard D, **Musset L**, Newton PN, Nkoghé P, Noya O, Ollomo B, Rogier C, Smithuis F, Veron V, Wide A, Zakeri S, Carme B, Chevillon C, **Legrand E**, Renaud F. **2010.** *Plasmodium falciparum* and humans: Together on the road? *First Seminario "Paludismo"*, 9 octobre, Caracas (Vénézuéla).
- **Legrand E, Musset L. 2009.** *In vitro* monitoring of *Plasmodium falciparum* drug resistance in French Guiana (1994 - 2008). *Réunion régionale des responsables nationaux des programmes de contrôle et de prévention du paludisme*, 10-12 novembre, Guayaquil (Equateur).
- **Valderramos S, Musset L, Valderramos JC, Johnson D, Petersen I, Legrand E, Fidock DA.** Mutant PfCRT does not confer high levels of chloroquine resistance to all strains of *Plasmodium falciparum*. *Abst n°940. 56th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 4-8 novembre **2007**, Philadelphie (USA) et *Abst n°36. MAM - Molecular Approaches to malaria*, 3-7 février **2008**, Lorne (Australie).
- **Musset L, Le Bras J, Clain J. 2006.** Multiple independent origins of atovaquone-proguanil *falciparum* resistance. *Abs n°297. 55th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 12-16 novembre, Atlanta, (USA).
- **Musset L, Moune M, Le Bras J, Clain J. 2005.** Diversité génétique du génome mitochondrial de *P. falciparum* et résistance à l'atovaquone-proguanil. *Congrès de la Société Française de Parasitologie*, 15-16 décembre, Paris (France).
- **Musset L, Bouchaud O, Massias L, Matheron S, Le Bras J. 2005.** Atovaquone/proguanil treatment failures in France in 2003-2004. *Abst n°O3. 1st International conference of the journal of travel medicine and infectious disease*, 10 novembre, Londres (Royaume-Uni).
- **Musset L, Massias L, Matheron S, Bouchaud O, Le Bras J. 2004.** Atovaquone/proguanil treatment failures in France in 2003-2004. *Abst n°116/27S. 6^{ème} European congress on chemotherapy and infection and 24^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse*, 1-3 décembre, Paris (France).
- **Musset L, Parzy D, Pradines B, Durand R, Bigot P, Le Bras J. 2004.** Absence of cytochrome b polymorphism in atovaquone resistant African isolates of *Plasmodium falciparum*. *Abst n°564. 53rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 7-11 novembre, Miami (USA).

Communications orales nationales

- **Mosnier E, Cropet C, Moriceau O, Lazrek Y, Michaud C, Gaillet M, Mathieu L, Demar M, Odonne G, Douine M, Pelleau S, Djossou F, Roux E, Musset L. 2018.** Répartition spatiale et facteurs de risque de portage de paludisme à la frontière entre la Guyane et le Brésil. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 19 décembre, Paris (France).

- Berthelot L, Lazrek Y, Volney B, **Musset L**. 2018. Prévalence des délétions des gènes *pfhrp₂* et *pfhrp₃* chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes. 2^{ème} journée des travaux scientifiques des jeunes médecins de Guyane, 7 Décembre, Cayenne (Guyane).
- Mosnier E, Bidaud B, Sanna A, Moriceau O, Dusfour I, Lazrek Y, Gaillet M, Travers P, Gauduchon S, Michaud C, de Laval F, Ardillon V, **Musset L**, Brousse P, Roux E. 2018. Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017. XXIV^{ème} Actualités du Pharo, 3-5 Octobre, Marseille (France).
- **Musset L**. 2018. Plasmodia on the Guiana Shield : a particular adaptation process driven by strong selective forces from the host. Journées annuelles du labex CEBA, 1^{er} octobre, Cayenne (Guyane). Conférence invitée.
- Moriceau O, **Musset L**, Barbosa R, Lazrek Y, Michaud C, Abboud P, Walter G, Cebe M, Djossou F, Mosnier E. 2018. Nouvelles stratégies de dépistage de terrain du paludisme : importance et rôle de l'infirmier coordinateur sur le projet PALUSTOP. 19^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie, 13-15 Juin, Rennes (France). Prix JNI meilleur présentation infirmier.
- Douine M, Sanna A, Galindo M, **Musset L**, Pommier de Santi V, Marchesini P, Magalhaes ED, Suarez-Mutis M, Hiwat H, Nacher M, Vreden S, Garancher L. 2018. Projet Malakit (paludisme et orpaillage) : un exemple d'adaptation à la prise en charge de populations vulnérables. Rencontre de santé publique Antilles-Guyane, 17-19 avril, Cayenne (Guyane).
- **Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. 2017. Efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement des accès palustres simples à *Plasmodium vivax* en Guyane. 18^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie, 21-23 Juin, Saint Malo (France).
- **Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. 2016. Efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement des accès palustres simples à *Plasmodium vivax* en Guyane. Journée annuelle du CNR Paludisme, 15 décembre, Paris (France).
- Pelleau S, Moss EL, Volney B, Casteras J, Legrand E, Neafsey DE, **Musset L**. 2014. Identification of a new molecular marker for *Plasmodium falciparum* drug susceptibility in French Guiana: potential implications for malaria control in South America. 9th Conference Louis Pasteur: Emerging Infectious Diseases, 09-11 avril, Paris (France).
- Hubert V, Dahlstrom S, Bertaux L, **Musset L**, Clain J, Le Bras J. 2014. Résistance de *Plasmodium falciparum* à l'atovaquone-proguanil : typage des souches importées en France métropolitaine 2002-2011. Congrès de la Société Française de Parasitologie, 09-11 mai, Rennes (France).
- Legrand E, Ariey F, Berger F, Menard D, Peneau J, Randrianarivelosoa M, Vial H, Fraisse L, **Musset L**. 2010. Etude multicentrique de l'activité antipaludique des molécules SSR97193 et SAR97276. 2^{ème} Journées interrégionales de la veille sanitaire, 8-9 octobre, Cayenne (Guyane).
- Djossou F, Naldjinan R, **Musset L**, Volney B, Demar M, Mahamat A, Abboud P, Blanchet D, Aznar C, Carme B, Legrand E. 2010. Surveillance *in vivo* des antipaludiques utilisés pour le traitement des accès palustres à *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* à Cayenne. Bilan d'étape. 2^{ème} Journées interrégionales de la veille sanitaire, 8-9 octobre, Cayenne (Guyane).
- Berger F, Girod R, Rosine J, Grenier C, Djossou F, **Musset L**, Legrand E, Ruello M, Sanquer MA, Gaborit P, Besançon L, Flamand C. 2010. Investigation d'une épidémie de paludisme, Saül (Guyane), janvier 2009. 2^{ème} Journées interrégionales de la veille sanitaire, 8-9 octobre, Cayenne (Guyane).
- Legrand E, Volney B, **Musset L**. 2008. Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* en Guyane (1994-2008). Journées InterRégionales de la Veille Sanitaire, 12-13 décembre, Fort de France (Martinique).
- Clain J, **Musset L**, Le Bras J. 2007. Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. Conférences Jacques Monod "Evolutionary genetics of host-parasite relationships". 22-26 septembre, Roscoff (France).
- **Musset L**, Moune M, Le Bras J, Clain J. 2005. Diversité génétique du génome mitochondrial de *P. falciparum* et résistance à l'atovaquone-proguanil. Congrès de la Société Française de Parasitologie, 15-16 décembre, Paris (France).

Communications affichées internationales

- Galindo M, Lambert Y, Suarez-Mutis MC, Mutricy L, Hiwat H, **Musset L**, Peterka C, Sanna A, Adenis A, Nacher M, Vreden S, Douine M. 2019. Experience from the field: how to implement a complex intervention study to control malaria in remote areas of the Amazon forest, within a cross-border context? Abst n°412. 68th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, November 20th to 24th, National Harbor (USA).
- Mok S, Ross L, Dhingra S, Yeo T, Shears M, Tripathi AK, **Musset L**, Sinnis P, Fidock DA. 2019. Examining the Epistatic Interaction Between Plasmepsin II and PfCRT in *P. falciparum* Piperaquine Resistance. Abst

- n°1553. 68th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, November 20th to 24th, National Harbor (USA).
- Salmier A, Bogreau H, Baniecki M, Ha Nguyen KY, Briolant S, Legrand E, Neafsey D, de Thoisy B, **Musset L**, Roux E. **2019**. Input from microsatellites and SNPs: a highly polymorphic and outbreak-driven *Plasmodium vivax* population in French Guiana. 7th International Conference of *Plasmodium vivax* research, 26-28th June, Paris (France).
 - Gaillet M, **Musset L**, Cropet C, Mallard A, Moriceau O, Djossou F, Nacher M, Mosnier E. Identification of social groups by their level of knowledge about malaria to support education programs in an Amazonian, multicultural and transborder context. Abst n°00456. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 13-16th, Amsterdam (Netherlands).
 - Mosnier E, Roux E, Cropet C, Lazrek Y, Gaillet M, Mathieu L, Nacher M, de Laval F, Pelleau S, Douine M, Abboud P, Bidaud B, Djossou F, **Musset L**. **2018**. Heterogeneous distribution of *Plasmodium vivax* and *falciparum* carriage on the border area between Brazil and French Guiana. Abst n°1034. 67th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, October 25th to November 1st, New Orleans (USA).
 - Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Lucchi NW, Ade MP, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, **Musset L**. **2018**. *In vitro* artemisinin resistance and the *pfk13* C580Y mutation in Guyana: a confirmed link and emergence. *Combating resistance! Microbes and vectors*, November 15-16th, Paris (France).
 - Manca MF, Jollivet A, Kezza C, Carles G, Misslin-Tritsch C, Barrelet A, Clouzeau J, Miller J, Boukhari R, Boex P, **Musset L**, Carod JF. **2018**. Endemic Malaria in West French Guiana: A 7 Years Retrospective Study. Poster n°6786. *American Society for Microbiology General Meeting & ICAAC, ASM Microbe*, 7-11th June, Atlanta (USA).
 - Rougeron V, Tiedje KE, Chen DS, Rask TS, Gamboa DV, Maestre A, **Musset L**, Legrand E, Noya O, Yalcindag E, Renaud F, Prugnolle F, Day KP. **2017**. Evolutionary structure of *Plasmodium falciparum* major variant surface antigen genes in South America: Implications for epidemic transmission and surveillance. *Abst n° LB-5230*. 66rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, 5-9th November, Baltimore (USA).
 - **Musset L**^{*}, Heugas C^{*}, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Volney B, Walter G, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald S, Legrand E, Demar M, Djossou F. **2017**. Highlighting of *P. vivax* resistance to chloroquine in French Guiana during a therapeutic efficacy evaluation. 6th International Conference of *Plasmodium vivax* research, 11-14th June, Manaus (Brazil).
 - Gabryzweski S, Modchang C, **Musset L**, Chookajorn T, Fidock DA. **2016**. Combinatorial genetic modeling of *pfcr*-mediated drug resistance evolution in *Plasmodium falciparum*. *Abst n°1499*. 65th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, 13-17th November, Atlanta (USA).
 - Douine M, Adenis A, **Musset L**, Demar M, Djossou F, Brousse P, Cairo H, Vreden S, Nacher M. **2015**. Malaria and illegal gold mines in a high income country: first description of the disease burden. *Abst n°308*. 64th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, 25-29th October, Philadelphia (USA).
 - Chenet SM, Okoth SA, Chandrabose J, Lucchi N, Talundzic E, Huber C, Macedo de Oliveira A, Krishnalall K, Ceron N, **Musset L**, Venkatesan M, Rahman R, Barnwell JW, Udhayakumar V. **2015**. Characterization of the K-13 propeller domain in Guyana for suspected artemisinin resistance. *Abst n°LB-5163*. 64th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, 25-29th October, Philadelphia (USA).
 - Cottrell G, **Musset L**, Hubert V, Le Bras J, Clain J. **2014**. Within-host emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports. *Abs n°225*. 10th Annual BioMalPar/EVIMalaR Conference: *Biology and pathology of the malaria parasite*, 12-15th May, Heidelberg (Germany).
 - Leba LJ, Popovici J, Houël E, Odonne G, Arnaud JO, Stien D, **Musset L**, Legrand E, Duplais C. **2014**. En route to new therapeutic and transmission-blocking molecules from Amazonian natural substances to control *Plasmodium falciparum* malaria. *Abs n°145*. 10th Annual BioMalPar/EVIMalaR Conference: *Biology and pathology of the malaria parasite*, 12-15th May, Heidelberg (Germany).
 - Trouvay M, Palazon G, Berger F, Volney B, Blanchet D, Faway E, Donato D, Legrand E, Carme B. **Musset L**, **2013**. High performance of PfHRP2-based RDTs in French Guiana explained by the absence of *pfhrp2* gene deletion in *P. falciparum*. *Late Breaker*. 62nd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, 13-17th December, Washington (USA).
 - WWARN *in vitro* Pilot Project Group, **2013**. Determining the global range of IC50 values for *Plasmodium falciparum* reference clones. *Abs n°B647*. 62nd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, 13-17th December, Washington (USA).

- **Musset L**, Salmier A, Legrand E, de Thoisy B. **2012**. An undifferentiated and polymorphic *P. vivax* population circulating in French Guiana between 2006 and 2010. *18th International Congress for Tropical Medicine and Malaria*, 23-27th September, Rio de Janeiro (Brazil).
- **Musset L**, Trouvay M, Palazon G, Volney B, Blanchet D, Legrand E, Berger F, Carme B. **2012**. Low prevalence of *pfhrp2* deletion in French Guiana: implications for malaria diagnosis. *Abs n° MAL038*, *18th International Congress for Tropical Medicine and Malaria*, 23-27th September, Rio de Janeiro (Brazil).
- **Musset L**, Salmier A, Legrand E, de Thoisy B. **2011**. Epidemic and interepidemic periods structure *Plasmodium vivax* population circulating in French Guiana between 2006 and 2010. *Abs n°1543*. *60th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 4-8th December, Philadelphia (USA).
- Valderramos SG, Valderramos JC, Lehane AM, **Musset L**, Purcell LA, Mercereau-Puijalon O, Legrand E, Kirk K, **Fidock DA**. **2009**. The genetic background of *Plasmodium falciparum* determines the extent to which mutant PfCRT confers resistance to chloroquine. *Abs n°890*. *58th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 18-22th November, Washington DC (USA).
- **Clain J**, **Musset L**, Moune M, Le Bras J. **2006**. Mitochondrial genome diversity of *Plasmodium falciparum* isolates supports multiple independent origins of atovaquone-proguanil resistance alleles. *Keystone malaria symposia : fonctionnal genomics to biology to medicine*, 28th February, Taos (USA).
- **Musset L**, Bouchaud O, Clain J, Matheron S, Massias L, Le Bras J. **2005**. Selection of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Abs n°838*. *54rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 14th December, Washington DC (USA).

Communications affichées nationales

- **Mosnier E**, Bidaud S, **Musset L**, Moriceau O, Gaillet M, Gauduchon S, Travers P, Brousse P, Lazrek Y, Sanna E. **2018**. Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017. Poster MV-ZOO-MIG-05. *19^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie*, 13-15 Juin, Rennes (France).
- Faway E, **Musset L**, Pelleau S, Volney B, Casteras J, Caro V, Menard D, Briolant S, **Legrand E**. **2016**. *Pvmdr1* polymorphism from *Plasmodium vivax* isolates in French Guiana. *Institut Pasteur International Network Symposium*, 29 novembre – 2 décembre, Paris (France).
- **Mosnier E**, Douine M, **Musset L**, Rhodes S, Gaudin O, Davy D, Epelboin L, Pieter P, Mutricy R, Djossou F. **2016**. Attitudes et pratiques vis-à-vis du paludisme dans une communauté amérindienne de Guyane. Poster n° TROP 14. *17^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie*, 7 au 9 juin, Lille (France).
- **Mosnier E**, Djossou F, Pelleau S, Douine M, Guarmit B, Brousse P, Mutricy R, Simonnet C, Gauduchon S, **Musset L**. **2016**. Importance du portage asymptomatique de plasmodies dans un quartier à transmission autochtone du paludisme en Guyane : enjeux pour une stratégie d'élimination. Poster n° TROP 15. *17^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie*, 7 au 9 juin, Lille (France).
- **Douine M**, **Musset L**, Corlin F, Pelleau S, Mutricy L, Blanchet D, Djossou F, Hiwat H, Demar M, Nacher M. **2016**. Paludisme et orpaillage en Guyane: une situation hétérogène mais alarmante. Poster n° PADS 02 06. *17^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie*, 7 au 9 juin, Lille (France). Poster discuté en 5 diapositives.
- **Musset L**, Trouvay M, Palazon G, Volney B, Blanchet D, **Legrand E**, Berger F, Carme B. **2012**. Faible Prévalence de la délétion du gène *pfhrp2* en Guyane : implications pour le diagnostic du paludisme. *3^{ème} Journées InterRégionales de Veille Sanitaire des Antilles-Guyane*, 26-27 octobre, Le Gosier (Guadeloupe).
- **Legrand E**, **Musset L**, Volney B, Meynard JB, Berger F, Mercereau-Puijalon O. **2010**. Etude de la variabilité génétique des gènes *pfcr1* et *pfmdr1* des isolats de *Plasmodium falciparum* de Guyane. *2^{ème} Journées interrégionales de la veille sanitaire*, 8-9 octobre, Cayenne (Guyane).
- **Berger F**, Girod R, Rosine J, Grenier C, Djossou F, **Musset L**, Ruello M, Sanquer MA, Gaborit P, Besançon L, Flamand C. **2009**. Investigation d'une épidémie de paludisme, Saül (Guyane), janvier 2009. *XV^{ème} Actualités du Pharo*, 17-19 septembre, Marseille (France).
- **Musset L**, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J et correspondants. **2005**. Echecs thérapeutiques de l'association atovaquone-proguanil en France en 2003-2005. *Congrès de la Société Française de Parasitologie*, 15-16 décembre, Paris (France).
- **Musset L**, Parzy D, Pradines B, Durand R, Le Bras J. **2004**. *Plasmodium falciparum* : étude du polymorphisme du gène du cytochrome *b* associé à la résistance *in vitro* à l'atovaquone. *42^{ème} Réunion du groupement des protistologistes de langue française*, 12-14 mai, Montpellier (France).

Résumé de mon parcours

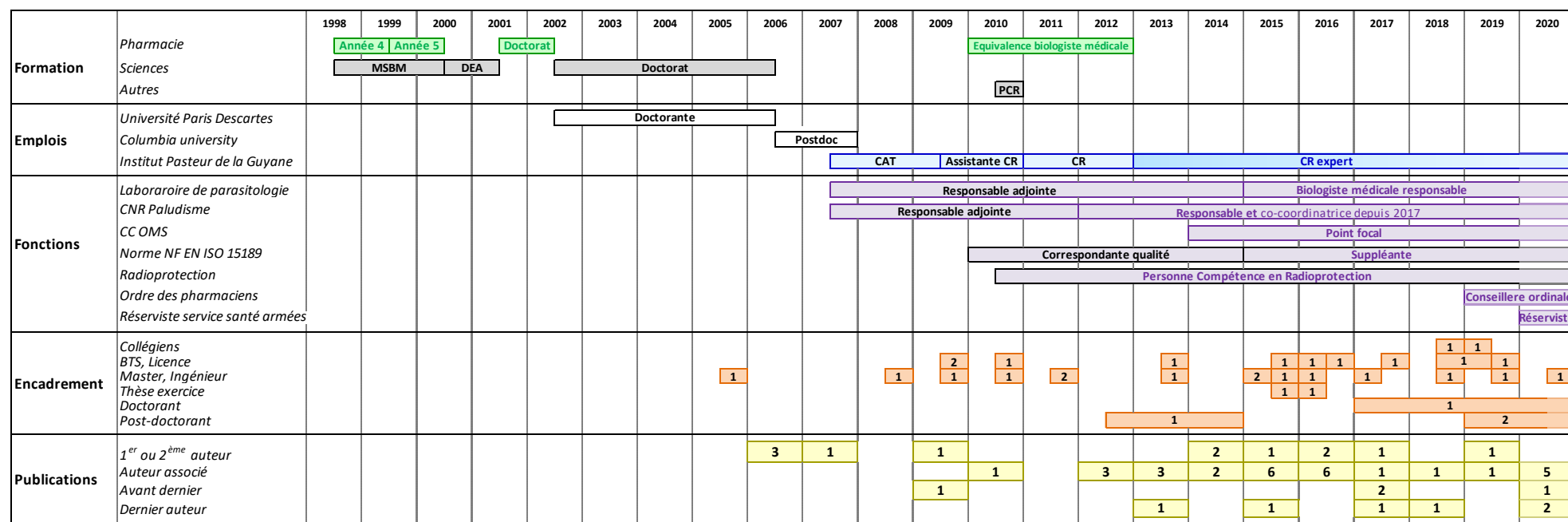
Lycéenne, j'étais déjà admirative du fonctionnement complexe et magique du corps humain. Comment l'évolution a-t-elle permis d'aboutir à un fonctionnement biologique aussi complexe, précis et robuste ? Après mon baccalauréat spécialité « Sciences de la Vie et de la Terre », je me suis donc orientée vers des études en santé et plus particulièrement, des études de pharmacie. Les premières années de pharmacie étaient très généralistes et abordaient de nombreuses disciplines telles que la chimie, la botanique, la zoologie, la physique ou encore les statistiques. C'est au cours de ces trois premières années d'études universitaires que j'ai découvert la parasitologie et toutes les pathologies qui en découlent et qui pour bon nombre d'entre elles, touchent les régions tropicales et inter-tropicales du globe. Cette localisation géographique faisait résonner en moi l'attachement que j'avais pour une région tropicale française, la Guyane. C'était donc décidé, la pharmacie d'officine ou hospitalière ne serait pas pour moi, je souhaitais devenir pharmacien-chercheuse et si possible sur une thématique qui me permette d'aller régulièrement en zone tropicale et inter-tropicale. J'ai donc commencé, en plus du cursus classique de pharmacie, à me spécialiser en parasitologie au cours d'une maîtrise des sciences biologiques et médicales. Après cela, et selon l'avis éclairé des parasitologues reimois, il me restait donc pour y arriver à obtenir : i) un DEA, ii) un financement de thèse, iii) une thèse, iv) un post-doctorat et enfin, bien plus complexe et incertain, v) un poste de chercheuse dans une institution de recherche, une université ou une industrie pharmaceutique... rien que cela (j'oublie d'ailleurs ici l'HDR dont on ne m'avait pas parlé à l'époque) ! Enfin, le cursus classique que tous les chercheurs connaissent bien mais qui, avec du recul, a bien de quoi en décourager plus d'un et impose du travail, de la constance et de la persévérance. A y regarder de plus près, il faut se lancer sans trop se poser de questions sinon ça pourrait faire peur !

Mes activités de recherche ont donc commencé en 2000, dans le cadre de mon DEA, au Centre National de Référence (CNR) chimiorésistance du paludisme à Paris à l'Hôpital Bichat-Claude Bernard sous la direction du Pr Jacques Le Bras (Figure 1). Le sujet de mon stage portait sur l'étude de la résistance de *P. falciparum*, agent du paludisme, à l'atovaquone-proguanil, une association d'antipaludiques tout juste mise sur le marché en France. Pour étudier cette association, j'ai ainsi eu à mettre au point un test *in vitro* permettant d'évaluer le niveau de sensibilité naturelle à l'atovaquone des parasites circulants en Afrique de l'Ouest et rapportés en France à l'occasion d'un voyage (☞ P1 pour publication n°1, ou Rx pour les revues cf liste du curriculum vitae).

Avant de débiter mon doctorat de sciences et au vu des obstacles à franchir avant de réussir à être chercheuse, mon directeur de thèse et moi avons fixé l'objectif suivant : l'obtention de mon doctorat de **pharmacien d'officine**. On ne sait jamais ce que la vie nous réserve ! J'ai donc effectué six mois de stage fin 2001 dans une officine à Paris, dans le XVII^{ème} arrondissement. Ainsi, j'ai soutenu mon doctorat en pharmacie début 2002 à Reims sur la base des résultats obtenus au cours de mon DEA.

Début 2002, j'ai débuté mon doctorat en science autour des perspectives obtenues au cours de mon DEA. Elle s'est déroulée dans le même laboratoire/CNR, toujours sous la direction du Pr Le Bras, dans le cadre de l'Ecole Doctorale du Médicament, Université René Descartes Paris 5, avec un financement du Ministère de la Recherche que j'ai obtenu grâce à mon classement honorable en DEA. Mon travail s'est donc concentré sur la compréhension du mécanisme de résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone/proguanil. Plusieurs aspects ont été abordés au cours de cette formation : i) générer des parasites résistants sous pression médicamenteuse (il y avait effectivement très peu de résistance naturelle ou circulante à l'époque dans la population parasitaire), ii) valider un marqueur moléculaire de résistance *in vivo* chez l'homme (☞ P2) et iii), comprendre le mécanisme d'émergence et de sélection de ces mutations chez un patient en échec thérapeutique (☞ P3). Ce travail a donné lieu à plusieurs publications et a permis de montrer que les premiers parasites résistants identifiés ne circulaient pas en Afrique de l'Ouest mais émergeaient *de novo*, chez des patients au cours de leur infection. Je suis devenue **docteure ès sciences** en juin 2006.

En 2006, j'ai décidé d'effectuer un **postdoctorat** dans le laboratoire de David Fidock dans le département de microbiologie et de médecine de l'Université Columbia à New York afin d'élargir mes connaissances techniques et de découvrir un autre environnement de recherche tout en continuant à étudier la résistance aux antipaludiques.



BTS : Brevet de Technicien Supérieur ; CAT : Cadre Administratif et Technique ; CC OMS : Centre Collaborateur de l’OMS ; CNR : Centre National de Référence ; CQ : Chloroquine ; CR : Chargée de recherche ; DEA : Diplôme d’Etudes Approfondies ; MSBM : Maîtrise des sciences biologiques et médicales ; PCR : Personne Compétente en Radioprotection

Figure 1. Présentation synthétique de mon parcours.

Mon sujet de postdoctorat portait sur l'étude d'un transporteur vacuolaire impliqué dans la résistance aux lysosomotropes, PfCRT (*Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*). Ce travail a été financé par le ministère des affaires étrangères sous la forme d'une bourse Lavoisier et a permis de générer des lignées isogéniques transformées à différentes positions du gène *pfCRT* pour retracer la genèse des allèles de résistance (**P27**). Cette thématique autour du gène *pfCRT* se poursuit encore aujourd'hui sur les isolats de Guyane.

Fin 2007, j'ai quitté New-York pour rejoindre le laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane en tant que **cadre administratif et technique** en CDD, responsable adjointe du laboratoire. Les dix-huit premiers mois ont été en grande partie consacrés à relancer les activités de santé publique du CNR Chimiorésistance du Paludisme (CNRCP) hébergé par le laboratoire : i) mise en place et sensibilisation d'un réseau de partenaires, ii) refonte du rapport d'activité, iii) réajustement des protocoles de phénotypages utilisés et harmonisation avec les laboratoires métropolitains, et iv) sensibilisation régulière du grand public lors de journées dédiées ou par la conception de fiches d'information.

En 2009, j'ai passé le concours de chercheur statutaire en biologie et santé publique de l'Institut Pasteur. J'ai intégré en septembre de la même année les cadres scientifiques de l'Institut Pasteur qualification "Assistante, chargé de recherche" détachée à l'Institut Pasteur de la Guyane. Entre 2010 et 2012, j'ai été promue "chargée de recherche" et en 2013, "**chargée de recherche expert**".

En 2012, j'ai eu à négocier le renouvellement de notre mandat de CNR auprès de l'InVS regroupant l'ensemble de la thématique « paludisme » (cf p.80). Aussi, une nouvelle organisation à quatre a dû être trouvée, trois laboratoires sur le territoire métropolitain et un en Guyane. C'est à cette occasion que je suis devenue **responsable du CNR Paludisme**, laboratoire associé pour la région Antilles-Guyane.

Tout au long de cette période, j'ai également mené un travail de fond au niveau international en participant autant que possible aux congrès et réunions internationaux de façon à augmenter la visibilité de notre laboratoire et de ses activités. J'ai à cette occasion pu construire un réseau professionnel conséquent et précieux qui me permet aujourd'hui d'approfondir les questions de recherche et d'augmenter l'impact des résultats obtenus (cf p.81). Cet investissement a abouti en 2014 à la désignation de notre laboratoire comme **Centre Collaborateur de l'Organisation Mondiale de la Santé (CC OMS)** pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques dont je suis **responsable** depuis l'origine (cf p.80).

Depuis mon arrivée en Guyane, je me suis attachée à développer des thématiques de recherche s'appuyant sur mes expériences antérieures mais surtout en lien avec le territoire où j'exerce, à savoir : i) la problématique du paludisme en Amazonie, ii) son épidémiologie sur le plateau des Guyanes et iii) les activités de CNR et CC OMS que le laboratoire poursuit respectivement depuis 32 et 6 ans. Trois axes structurent ainsi la recherche : i) comprendre les mécanismes de résistance des plasmodies aux antipaludiques d'intérêt et leur évolution (cf p.35), ii) élargir les connaissances sur *P. vivax*, espèce prédominante dans la zone (cf p.56) et, iii) conduire des projets de recherche opérationnelle indispensables à l'optimisation de la prise en charge et du contrôle du paludisme dans la région (cf p.61).

La **recherche en santé publique** que je conduis se veut pluridisciplinaire, transversale et translationnelle, du malade au laboratoire en passant par les lieux de prise en charge et les zones de transmission. Forte de mon expertise, je tente en permanence de faire le lien entre les autorités sanitaires locales, nationales ou internationales et le monde de la recherche. Vulgariser les résultats, mesurer ce qu'ils impliquent et obtenir l'adhésion des décideurs pour qu'ils ajustent les programmes de lutte contre la maladie. Faire le lien aussi entre le temps long de la recherche, des démarches administratives associées et des décisions/concertations publiques, et la nécessité permanente d'améliorer rapidement la prise en charge des patients.

Ces travaux m'ont permis d'être aujourd'hui à l'origine ou associée à **51 publications** dont six revues. Les trois publications dont je suis la plus fière sont annexées à ce document. Mes perspectives en termes de recherche (Tableau 3, cf p.77) sont nombreuses et s'inscrivent dans ces mêmes axes en visant toujours à travailler dans l'intérêt des malades et des habitants de nos zones à risque. Une des perspectives sera aussi à court terme de renforcer les activités d'éducation sanitaire en milieu scolaire.

L'ensemble de ces activités de recherche est accompagné d'activités de formation et d'encadrement d'étudiants et de jeunes chercheurs du niveau BTS au niveau post-doctorant. Depuis le début de mon engagement dans la transmission de savoir, j'ai eu l'opportunité et la chance d'**encadrer 33 jeunes** (cf p.20 et **Erreur ! Signet non défini.**). La moitié avait un niveau master ou plus et incluait deux thèses d'exercice et une thèse de sciences en co-encadrement. Cette contribution à la formation des plus jeunes est pour moi une composante fondamentale de l'activité d'une chercheuse. Un scientifique doit pouvoir transmettre son savoir

et son savoir-faire et initier les plus jeunes à une culture scientifique et une approche méthodologique rigoureuse, basée sur un esprit critique et rationnel qui s'enrichit de l'expérience de la communauté, au sens large, qui nous entoure.

Par ailleurs, en tant que chercheuse dans le domaine du paludisme localisé en zone d'endémie et en tant que laboratoire de référence ayant de fortes implications en santé publique, il m'est difficile de concevoir mon métier sans y associer régulièrement des activités d'animation et de vulgarisation scientifique à destination du grand public et de plus en plus en milieu scolaire (cf p.22).

Par ailleurs, je suis depuis 2015 **responsable du laboratoire** et coordonne les activités de 5 à 9 personnes (cf p.86). Je prête une attention toute particulière à la définition d'orientations et objectifs pour le laboratoire qui sont annuellement présentés de manière à ce que chaque membre de l'équipe se les approprie et y trouve motivation et intérêt. Des temps d'échanges réguliers sont également ménagés individuellement de manière à maintenir une ambiance de travail satisfaisante basée sur des discussions libres autour des difficultés rencontrées ou des satisfactions obtenues.

Entre 2010 et 2014, j'ai été **correspondant qualité** du laboratoire ayant en charge le déploiement de la démarche qualité au sein du laboratoire. Ceci a abouti en août 2017 à l'accréditation de la PCR de diagnostic en temps réel d'espèces utilisée au sein du CNR selon la norme NF EN ISO 15189. La politique qualité du laboratoire que j'ai mise en place vise à ce que l'ensemble du fonctionnement du laboratoire bénéficie de cette démarche y compris les activités de recherche (cf p.84). Ainsi, cette évolution de statut des CNRs me permet d'exercer des fonctions de **biologiste médicale**. En 2018, j'ai été élue **conseillère ordinale** de la section E et je suis depuis 2020 réserviste du service de santé des armées. Enfin, depuis 2010, je suis la **conseillère en radioprotection** de l'Institut Pasteur de la Guyane gérant les aspects liés à la manipulation, détection de radioéléments (cf p.85).

Dans la suite de cet exposé, je présenterai dans le détail les différents travaux et résultats que j'ai pu obtenir au cours de mon parcours et l'implication dont j'ai fait preuve en matière d'encadrement. Au travers de ce document, j'espère pouvoir vous donner un aperçu complet de mon identité en tant que chercheuse, identité façonnée à partir de mes valeurs personnelles, ce qui m'anime, des rencontres et des opportunités que j'ai pu rencontrer ou initier.

Activités de recherche

Résultats et perspectives

- 1) Compréhension et dynamique des résistances aux antipaludiques
- 2) Etude de *Plasmodium vivax* en Guyane
- 3) Une recherche opérationnelle au service du contrôle du paludisme

Ce mémoire est assez dense, de manière à rendre sa lecture plus didactique, des symboles ont été ajoutés de manière à faciliter l'analyse des informations qu'il contient :



Activités d'encadrement d'étudiants et jeunes scientifiques que j'ai conduites



Mes publications scientifiques (hors communications), numérotées par ordre chronologique



Contexte et/ou mise en perspective du projet et/ou des résultats associés en termes de santé publique



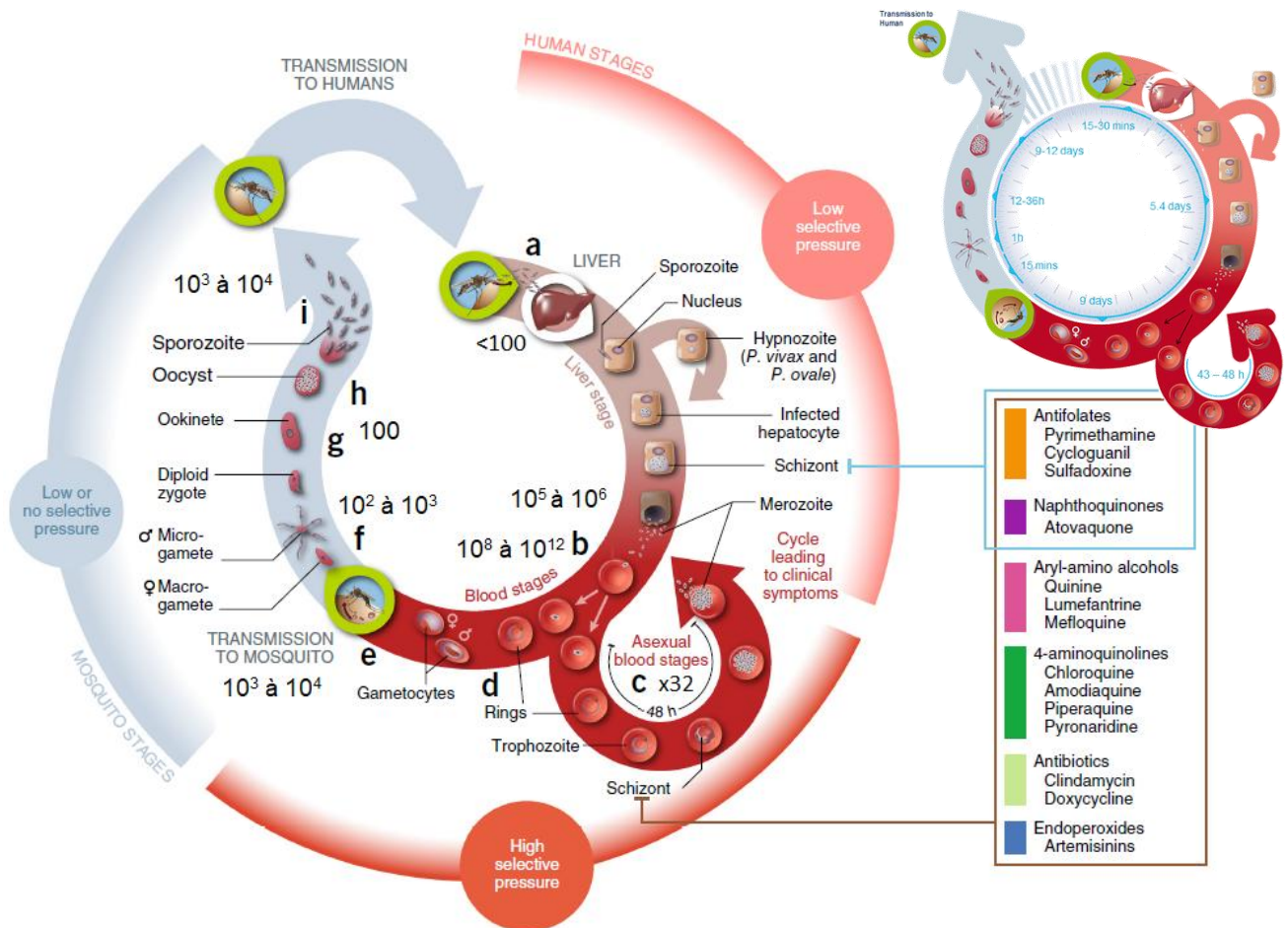
Perspectives associées au projet, à la thématique

COMPREHENSION ET DYNAMIQUE DES RESISTANCES AUX ANTIPALUDIQUES

Les plasmodies sont des parasites unicellulaires eucaryotes responsables du paludisme. Leur cycle de développement est rapide et exponentiel. Elles se multiplient théoriquement d'un facteur 32 en 48h, durée d'un cycle érythrocytaire au sein d'un globule rouge infecté pour *Plasmodium falciparum*, *vivax* et *ovale*. Ainsi, un patient infecté compte dans son sang entre 10^8 et 10^{12} parasites circulants auxquels s'ajoutent les parasites qui peuvent être séquestrés dans les microvaisseaux, la rate ou la moelle osseuse (Figure 2) (Anderson and Roper 2005). Leur cycle de développement inclut des changements d'hôtes et de stades réguliers, des phases de multiplication asexuées chez l'Homme, l'hôte intermédiaire, et une phase de multiplication sexuée chez le moustique du genre *Anopheles*, l'hôte définitif. Ces changements successifs ne sont possibles sur le plan biologique que grâce aux nombreux mécanismes de régulation cellulaire et de recombinaison intervenant à différents moments du cycle. Cette plasticité permet une adaptation rapide des plasmodies au milieu dans lesquelles elles évoluent. Les pressions environnementales exercées sur elles incluent notamment les moyens de lutter contre cette pathologie, essentiellement les antipaludiques.

Schématiquement, les antipaludiques peuvent être classés en fonction de leur mécanisme d'action en deux grandes catégories: les lysosomotropes (chloroquine, quinine, méfloquine....) qui s'accumulent dans un organite acide du parasite, la vacuole digestive, et les antimétabolites (pyriméthamine, atovaquone.....) qui sont des inhibiteurs compétitifs d'enzymes du métabolisme (Figure 2). A ces deux grandes catégories viennent aujourd'hui s'ajouter les dérivés de l'artémisinine. Ces principes actifs ont pour métabolite actif la dihydro-artémisinine. Leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé tout comme leur localisation. Cependant, leur pont endoperoxide est activé par la molécule d'hème Fe^{2+} et ce majoritairement au stade rings (Xie, Dogovski et al. 2016). Une fois activée, l'artémisinine va se fixer sur les protéines pour les alkyliser ou les ubiquitiner entraînant leur déstabilisation et leur dégradation au sein du protéasome (Talman, Clain et al. 2019).

La résistance aux antipaludiques est définie par l'OMS comme la capacité d'une souche parasitaire à survivre et/ou se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un antipaludique donné à dose égale ou supérieure à celle généralement recommandée (WHO 2018). C'est un phénomène dynamique et évolutif, irrémédiable, qui apparaît pour toutes les molécules. Cependant, cette sélection est plus ou moins rapide et sous l'influence de nombreux facteurs incluant le nombre de parasites exposés aux différents stades (Figure 2), la spécificité d'action du médicament, sa demi-vie, le niveau d'immunité de l'hôte, la multiplicité de l'infection et les facteurs locaux qui affectent l'utilisation d'un principe actif. Un autre facteur majeur influençant la rapidité de sélection des parasites résistants est le mécanisme de résistance impliqué. La résistance apparaît généralement rapidement pour les molécules dont l'acquisition d'un petit nombre de mutations ponctuelles au niveau d'un gène codant la protéine cible (ex : les antimétaboliques) suffit à rendre les parasites résistants. Celle-ci est sélectionnée beaucoup plus lentement pour les principes actifs qui possèdent un mécanisme de résistance complexe faisant intervenir plusieurs transporteurs, très souvent vacuolaires, qui induisent une perte d'accumulation des molécules dans le parasite (ex : les lysosomotropes). Compte tenu du cycle de développement des plasmodies, on peut observer que la pression médicamenteuse est très élevée au moment du cycle érythrocytaire lorsque les parasites sont les plus nombreux et la probabilité de présence d'un individu modifié et adapté à résister à ce principe actif est la plus grande. Cette pression est également augmentée lorsque la demi-vie de la molécule est longue ce qui augmente le temps de contact parasite/molécule. *A contrario*, cette probabilité est plus faible lorsque la demi-vie des molécules est courte (ex : artémisinine \approx 2h) ou lorsque les parasites sont dans leurs stades de développement hépatiques car ils sont moins nombreux, se répliquent peu, ou pas pour les hypnozoïtes de *P. vivax* (White 2004, Blasco, Leroy et al. 2017) (Figure 2).



Adapté de Blasco, 2017

Figure 2. Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*, charge parasitaire et antipaludiques.

(a) C'est lors d'un repas sanguin nécessaire à la maturation de ses œufs qu'un moustique femelle, du genre *Anopheles*, infecté par *P. falciparum* inocule des sporozoïtes dans le derme de l'hôte intermédiaire, l'Homme (Blasco, Leroy et al. 2017). Moins de 100 sporozoïtes sont ainsi injectés (Alavi, Arai et al. 2003). Après une rapide migration tissulaire et sanguine, ces sporozoïtes pénètrent activement dans les hépatocytes grâce aux différents organites du complexe apical spécifique de l'embranchement des *Apicomplexa* (conoïde, granules denses, rhoptries et micronèmes). Une phase de réplication active produit au bout de cinq jours et demi environ 10 000 à 30 000 descendants de mérozoïtes par parasite intracellulaire. (b) Les mérozoïtes libérés ($\sim 10^5$ à 10^6 au total) envahissent ensuite les globules rouges matures humains. Transformé en trophozoïte, ils se développent à l'intérieur d'une vacuole parasitophore et initient des cycles de multiplication d'environ 48 h au cours duquel ils forment des schizontes puis, après plusieurs divisions, un corps en rosace composé de 32 mérozoïtes. (c) Une fois libérés de manière active, les nouveaux mérozoïtes vont alors coloniser d'autres globules rouges sains. C'est la phase érythrocytaire de reproduction asexuée ou schizogonie où la charge parasitaire peut atteindre 10^8 à 10^{12} . A ce moment du développement, les parasites sont alors responsables des manifestations cliniques de la maladie. (d) Les trophozoïtes peuvent également, si les conditions de développement se dégradent (présence de principes actifs dans le sang, pression immunitaire forte, anémie, infection mixtes...), se transformer en gamétocytes mâles ou femelles. Les gamétocytes jeunes sont alors sequestrés dans la moelle osseuse avant d'en ressortir au stade V, le stade mature permettant après trois jours dans la circulation sanguine la fécondation chez le moustique (Henry, Serme et al. 2019). Environ 1 à 2% des parasites intra-érythrocytaires entrent dans cette voie de développement sexué qui en 10 à 12 jours environ produit des gamétocytes mâles et femelles matures transmissibles aux moustiques. (e) Environ 10^3 à 10^4 gamétocytes matures sont absorbés au cours d'un repas de sang. (f – i) La reproduction sexuée ou sporogonie se déroule chez l'hôte définitif, l'Anophèle, qui est aussi le vecteur de cette pathologie. Chez le moustique, les gamétocytes se transforment des gamètes mâles et femelles ($\sim 10^2$ à 10^3) qui peuvent se féconder (f), formant environ 100 ookinetes (g), puis des oocystes (h). A la fin de leur développement, les oocystes libèrent 10^3 à 10^4 sporozoïtes dans la cavité générale de l'insecte qui iront rejoindre les glandes salivaires dans l'attente de leur inoculation à un nouvel hôte lors d'un deuxième repas sanguin (i).

Pour les espèces plasmodiales, *P. vivax* et *P. ovale*, certains parasites peuvent rester dans le foie sous forme d'hypnozoïtes et générer des accès palustres plusieurs mois voir plusieurs années après l'accès initial.

Les antipaludiques actuellement utilisable chez l'Homme sont listés dans les encadrés figurant au côté du cycle. En plus de leur action sur les stades asexués, la pyriméthamine, sulfadoxine, proguanil et l'atovaquone ont une action sur les stades hépatiques du parasites. Les artémisinines agissent elles aussi sur les stades précoces des gamétocytes. Seule la primaquine a une action sur les stades sexuels matures et permet ainsi de limiter instantanément la transmission du paludisme ou encore tuer les hypnozoïtes hépatiques de *P. vivax*.

Méthodes d'étude et paramètres associés

Pour caractériser la résistance parasitaire, trois grandes catégories de méthodes existent : les études *in vivo* qui permettent d'évaluer l'**efficacité thérapeutique des antipaludiques** chez le patient, les méthodes *in vitro* qui permettent d'évaluer la sensibilité des parasites au laboratoire et les méthodes de biologie moléculaire qui permettent de détecter les changements liés à la résistance au sein du génome. Ces trois grands types de méthode s'éclairent l'une l'autre. Ainsi, une bonne méthode *in vitro* doit avoir été mise au point et être interprétée en fonction des résultats observés *in vivo* avec les mêmes parasites. Ce modèle biologique permet de s'affranchir des variations inter-individuelles liées à la prise de médicament, leur absorption ou encore de l'effet du système immunitaire du patient qui peut être en capacité d'éliminer naturellement des parasites résistants aussi bien que les sensibles. Il existe aujourd'hui deux principales méthodes de phénotypage, le **test isotopique** qui mesure la capacité d'un antipaludique à inhiber la croissance parasitaire, CI_{50} pour concentration inhibitrice 50% (Le Bras and Deloron 1983) et le **test de survie** qui, après une courte exposition à la molécule, mesure la capacité des parasites à survivre et à se multiplier, soit un taux de survie exprimé en pourcentage (Witkowski, Amaratunga et al. 2013). Le deuxième type de test a été mis au point pour étudier essentiellement les artémisinines et ses dérivés. Ainsi, c'est souvent grâce aux méthodes *in vitro* que les **marqueurs moléculaires** de la résistance sont identifiés. Ces marqueurs présentent l'immense avantage d'être facile à étudier à partir d'échantillon de sang séché sur papier buvard et ce, même si les parasites sont morts. Les méthodes *in vitro* sont donc très importantes et nécessitent bien évidemment des parasites vivants ayant la capacité de se multiplier en condition de laboratoire. La **multiplication *in vitro* de *P. falciparum*** a été mise au point à la fin des années 1970, celle de *P. vivax* ne l'est pas encore (Trager and Jensen 1976).

Pendant plusieurs décennies, les études ont été conduites sur quelques souches de référence adaptées dans les années 1980. Aujourd'hui, quelques laboratoires situés en zone d'endémie adaptent des parasites de terrain à la multiplication *in vitro*. Ils ne sont cependant pas si nombreux car cela nécessite des infrastructures, une maîtrise totale de la technique et du personnel formé, tout cela en zone de transmission. Depuis 2009, j'ai beaucoup misé sur cet aspect. Après environ une année de mise au point de la méthode, notre laboratoire maîtrise aujourd'hui totalement cette technique. Nous adaptons donc systématiquement dans le cadre de nos activités de CNR les isolats de *P. falciparum* que nous recevons, pour certains jusqu'à 7/8 jours après leur prélèvement. Cette adaptation est immédiate, ce qui nous laisse penser que les parasites souffrent peu de cette adaptation et donc accumulent probablement peu de modifications génétiques associées à cette mise en culture (Nair, Li et al. 2018). Cette limitation des changements génétiques est fondamentale pour toutes les questions de recherche que l'on se pose autour des mécanismes et de l'acquisition de la résistance.

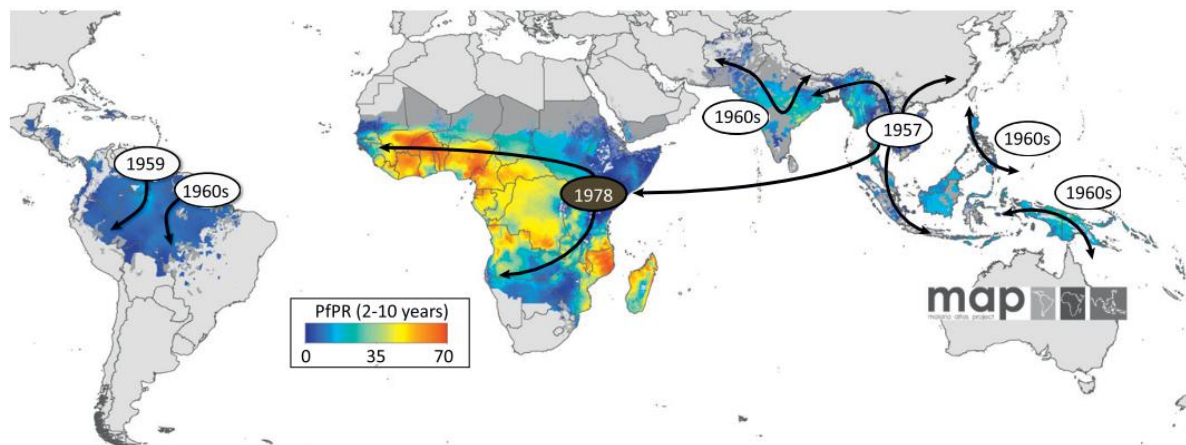
Enfin, l'autre technique de pointe que nous mettons en œuvre dans le cadre de cet axe de recherche vise à générer des lignées isogéniques de plasmodies. En effet, pour valider un marqueur moléculaire, nous l'introduisons au sein de parasites récemment adaptés, sensibles, provenant de notre zone de transmission, par **recombinaison homologue**. Ainsi, les souches ne diffèrent que par le marqueur étudié et nous pouvons ainsi valider ou invalider le lien causal entre cette modification génétique et le phénotype observé.

Depuis peu, nous utilisons de plus en plus les données de **séquençage haut débit** pour identifier les marqueurs de résistance sur la base de parasites phénotypés. Cette technique se démocratise de plus en plus et est de moins en moins coûteuse. Elle nécessite cependant des compétences en bioinformatique et des capacités de calculs qui sont difficiles à mettre en place au sein de l'Institut Pasteur de la Guyane. Nous travaillons donc en collaboration sur ces aspects.

Histoire courte de l'utilisation des antipaludiques et résistances associées

Le premier composé à avoir été utilisé en thérapeutique est la quinine, depuis le XVII^{ème} siècle. Durant la Deuxième Guerre mondiale, le besoin croissant en quinine et les carences régulières ont conduit les scientifiques de l'époque à élaborer et tester des centaines de molécules de synthèse dérivées de la quinine et appartenant à la famille des amino-4-quinoléines. C'est ainsi qu'ils ont identifié la chloroquine qui a ensuite été massivement utilisée et pendant plus de vingt ans, sans résistance. Cependant, au début des années 60, des résistances sont décrites en Colombie et au Venezuela puis à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande (Payne 1987). À la fin des années 1990, l'avènement des différentes techniques de biologie moléculaire a permis l'identification, *a posteriori*, du marqueur moléculaire lié à la résistance à la chloroquine, la mutation K76T dans le gène *pfcr* (Fidock, Nomura et al. 2000). Ce marqueur et l'étude de la diversité génétique autour de ce gène ont permis d'identifier six points d'émergence, indépendants mais simultanés de

la résistance, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud. C'est à partir de ces quelques foyers que les parasites résistants, sous l'influence de la pression médicamenteuse, ont disséminé à l'ensemble des zones de transmission pour atteindre l'Afrique au cours des années 80 (Ecker, Lehane et al. 2012, Awasthi and Das 2013) (Figure 3). Les mécanismes évolutifs ayant permis d'aboutir à ces parasites résistants, viables et se transmettant efficacement, ont probablement été nombreux. Cependant, les outils de biologie moléculaire étant apparus après l'émergence de la résistance, les connaissances actuelles de la résistance à la chloroquine sont basées sur l'étude d'individus résistants issus de plusieurs décennies d'évolution sous pression médicamenteuse (Anderson and Roper 2005).



Ecker, 2012

Figure 3. Emergence et dispersion de la résistance à la chloroquine chez *Plasmodium falciparum*. Carte présentant le taux d'infection à *P. falciparum* chez les 2-10 ans utilisant un modèle géostatistique. Six origines indépendantes de la résistance à la chloroquine ont été identifiées *a posteriori*. Il semblerait que les parasites asiatiques résistants se soient propagés aux zones d'endémie africaines à la fin des années 70 (cercle noir) par le biais des mouvements de populations humaines et des pressions médicamenteuses.

La perte d'efficacité de la chloroquine a conduit à l'utilisation de la sulfadoxine/pyriméthamine dans les années 70. Cependant, la résistance à cette association thérapeutique a très vite été sélectionnée puis s'est répandue en suivant le même chemin que la résistance à la chloroquine. Apparue d'abord en Asie du Sud-Est à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande puis en Amérique du Sud, la résistance s'est ensuite dispersée en Afrique (Cortese, Caraballo et al. 2002). Face à ce phénomène, d'autres antipaludiques ont été déployés – méfloquine, halofantrine, amodiaquine –, mais irrémédiablement, les mécanismes de l'évolution ont conduit à un échappement des plasmodies aux pressions qu'elles subissaient, dans le cas présent, les antipaludiques.

Ainsi, dans les années 2000, sur le même principe que ce qui se faisait pour la tuberculose et le VIH, les recommandations ont été de déployer des associations d'antipaludiques, deux dans un premier temps, pour retarder l'apparition des résistances. Jusqu'à ce jour, les bithérapies sont utilisées. Elles associent systématiquement un dérivé de l'artémisinine qui tue très rapidement les parasites et diminue le nombre de parasites exposés au deuxième principe actif, une molécule dite partenaire. La pharmacodynamique des principes actifs a largement guidé l'élaboration de ces associations : une artémisinine à demi-vie courte puis une molécule partenaire à demi-vie plus longue (ex : luméfántrine) voire, très longue pour la pipéraquline (22 jours). Ces associations à base de dérivés de l'artémisinine (ACT) sont recommandées en première ligne dans le monde entier excepté Haïti où la chloroquine est encore efficace. Les résistances observées en Asie du Sud-Est aux ACTs poussent à changer de stratégie pour associer maintenant trois molécules (Dipanjan, Shivaprakash et al. 2017). Les essais cliniques pour valider de telles associations sont en cours. La quinine associée à une tétracycline reste une deuxième ligne du traitement des cas graves. Peu de résistance à la quinine sont aujourd'hui rapportée alors que cette molécule est utilisée depuis plus de quatre siècles (Okombo, Ohuma et al. 2011).

Dans la suite de ce mémoire, j'ai choisi de vous détailler trois axes sur lesquels j'ai travaillé ou travaille encore autour de la compréhension des mécanismes de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques. Il s'agit de : i) la résistance à l'atovaquone-proguanil, ii) l'implication du gène *pfcr*t dans la résistance aux amino-4-quinoléines et enfin, iii) la résistance aux artémisines sur le plateau des Guyanes.

Résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone/proguanil : déterminants et évolution

Porteurs de projet : J. Le Bras, J. Clain
Collaborations : G. Cottrell, IRD, Paris, France
B. Pradines, IMTSSA, Marseille, France
Financement : Institut National de Veille Sanitaire

♦ L'atovaquone/proguanil a été mise sur le marché en France au début des années 2000 pour le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum*. Très bien tolérée, elle est rapidement devenue le traitement de choix dans de nombreux hôpitaux français. Dès le début de ce travail en 1999, il nous est donc apparu nécessaire d'approfondir nos connaissances sur le(s) mécanisme(s) de résistance du parasite à cette association afin de pouvoir prévenir et déceler toute perte éventuelle d'efficacité dans les meilleurs délais, à l'aide d'outils adaptés et facile d'utilisation.

Évaluation de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à l'atovaquone et détermination du seuil de résistance

Afin de pouvoir détecter les isolats résistants, mes premiers objectifs de thèse ont été de : i) mettre au point un test de chimiosensibilité *in vitro* à l'atovaquone, ii) définir un seuil de résistance corrélé avec l'efficacité thérapeutique observée chez les patients sous traitement et, iii) évaluer le niveau de sensibilité naturelle des parasites circulants en Afrique et importés en France par des voyageurs. J'ai ainsi montré sur la base d'un échantillonnage de 477 isolats collectés chez des voyageurs au retour d'Afrique de l'Ouest, que la population parasitaire circulant dans cette région, non exposée à la pression médicamenteuse par atovaquone-proguanil, était naturellement sensible *in vitro* à l'atovaquone. La confrontation de ces résultats aux données d'efficacité thérapeutique obtenues *in vivo* chez les patients traités par cette même association et suivis à l'hôpital Bichat m'a également permis de définir un premier seuil de résistance *in vitro* à l'atovaquone à 1600nM. Depuis cette étude, de nouveaux échecs thérapeutiques ont permis d'affiner ce seuil de corrélation *in vivo/in vitro* et de l'abaisser à 350nM (Savini, Bogreau et al. 2008).

📖 **P1. Musset L**, Pradines B, Parzy D, Durand R, Bigot P, Le Bras J. Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *J Antimicrob Chemother*, 2006. 57: 110-115. IF n+2: 4.716.

Validation d'un marqueur moléculaire de résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone pour la surveillance

Le phénotypage *in vitro* des parasites est une méthode lourde nécessitant un équipement conséquent, du personnel formé à la culture cellulaire, la manipulation de radioéléments et surtout un acheminement des échantillons au laboratoire en moins de 4 jours pour permettre la survie des parasites. Pour faciliter la surveillance des résistances, mon deuxième objectif était de valider un marqueur moléculaire permettant d'identifier rapidement les parasites résistants à l'atovaquone. Certains auteurs avaient préalablement montré, chez des parasites résistants générés par pression médicamenteuse, que le gène codant le cytochrome *b* était impliqué dans la résistance à l'atovaquone. En collaboration avec les services de maladies infectieuses des Hôpitaux de Paris, j'ai participé à la mise en place d'un suivi systématique des patients traités par atovaquone/proguanil. Ainsi, entre février 2002 et septembre 2005, 10 échecs thérapeutiques parmi 469 patients suivis ont été identifiés. Les dosages plasmatiques de principe actif ont permis de montrer que les recrudescences précoces, avant J16, étaient liées à une mauvaise absorption de l'atovaquone alors que les échecs tardifs (<0,1%) étaient quant à eux liés à la présence de parasites hautement résistants à l'atovaquone *in vitro*. J'ai ainsi pu montrer que la résistance à l'atovaquone/proguanil était associée, au moment de la recrudescence, à la présence d'une mutation au niveau du codon 268 du gène codant le cytochrome *b* et que cette mutation induisait un très haut niveau de résistance *in vitro* (sensibilité 4000 fois plus faible). Cette mutation présentait cependant la particularité d'être indétectable au moment du diagnostic initial, avant la mise en place du traitement (J0).

📖 **P2. Musset L**, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. *Microbes Infect*, 2006. 8: 2599-2604. IF n+2: 2.80.

📖 **R1. Le Bras J, Musset L, Clain J.** Antimalarial drug resistance. *Med Mal Infect*, 2006. 36: 401-405. IF n+2: 0.62.

Élucidation du mécanisme d’émergence de la résistance à l’atovaquone-proguanil

Une fois le marqueur moléculaire validé et corrélé à l’efficacité thérapeutique, je me suis intéressée à l’histoire évolutive de la résistance à l’atovaquone/proguanil visant à comprendre pourquoi cette mutation était indétectable au moment du diagnostic initial à J0. Était-elle largement minoritaire dans la population parasitaire infectant le patient et donc indétectable par les méthodes de biologie moléculaire classiques ? Ou était-elle absente ?

Dans un premier temps, j’ai adapté une méthode utilisée en cancérologie pour la détection d’allèles rares (Kahn, Jiang et al. 1991). Elle est basée sur la neutralisation de l’amplification du génotype sauvage pour favoriser l’amplification du génotype mutant. Elle a permis, dans notre cas, d’atteindre une sensibilité de détection d’une copie mutante parmi 1000 copies sauvages. Elle n’a cependant pas permis d’identifier de parasites mutants chez nos isolats J0 issus de patients en échec thérapeutique.

Dans un deuxième temps, je me suis orientée vers l’analyse complète du génome mitochondrial des parasites isolés à J0 et de ceux isolés au moment de l’échec thérapeutique (Jx). Ce génotypage a ensuite été complété par l’analyse de cinq marqueurs microsatellites polymorphes situés sur différents chromosomes nucléaires. Ainsi six paires d’échantillons (cinq isolats, une souche de référence) ont pu être analysées et ont révélées une identité parfaite entre les séquences mitochondriales obtenues et les cinq marqueurs nucléaires analysés, à l’exception de la position 4294 du génome mitochondrial correspondant au codon 268 du gène du cytochrome *b* (Tableau 1).

Tableau 1. Diversité génétique parasitaire avant et après échec thérapeutique par atovaquone-proguanil.

		Génome mitochondrial ^a																Microsatellite ^b														
		6	7	7	8	8	1	5	6	7	9	6	1	6	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	5	T	T	A	P	T		
		8	0	0	6	8	6	0	9	7	1	4	6	1	9	8	5	2	7	5	5	8	6	8	7	A	A	R	f	A		
		4	8	9	7	9	3	7	2	6	1	7	5	7	4	7	0	2	8	2	2	7	0	2	2	A	A	A	K	8		
Patient ^c		r	r	r	s	s	n	r	i	i	i	n	n	s	n	s	n	s	i	i	r											
Failures	IVC ₁ D0	A	*	*	G	T	G	A	G	T	C	C	C	A	A	G	C	A	G	C	*	83	89	104	168	178						
	IVC ₁ D26	.	*	*	G	*	83	89	104	168	178						
	IVC ₂ D0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	.	.	nd	nd	nd	nd	.	.	nd	nd	nd	nd	nd	83	77	101	171	175						
	IVC ₂ D39	.	*	*	T	.	.	T	C	T	T	83	77	101	171	175					
	UPV ₁ D0	.	*	*	T	*	83	86	110	174	172						
	UPV ₁ D28	.	*	*	T	.	C	*	83	86	110	174	172						
	UPV ₂ D0	.	*	*	n	.	n	A	.	.	.	*	80	71	98	165	175						
	UPV ₂ D22	.	*	*	G	A	.	.	.	*	80	71	98	165	175						
	UPV ₃ D25	.	*	*	C	*	80	86	104	162	166					
	GUI ₁ D0	.	*	*	.	.	A	.	T	G	.	*	92	86	104	165	178						
	GUI ₁ D26	.	*	*	.	.	A	.	T	C	.	.	G	.	*	92	86	104	165	178						
	THA ₁ D0	.	*	*	C	*	95	77	104	165	175						
	THA ₁ Dfail	.	*	*	C	C	*	95	77	104	165	175						

^a Seules les positions mutantes sont représentées. La position 4294 en gras est associée à la résistance à l’atovaquone-proguanil (a4294g = Y268C ; a4294c = Y268S). s: mutation synonyme, n: mutation non synonyme, r: variation au niveau des séquences de l’ARNr, i: région intergénique. Les points représentent les identités avec la séquence de référence, les astérisques : l’absence d’insertion à cette position, nd: non déterminé.

^b Taille de l’allèle en paire de base (pb) listées pour cinq marqueurs microsatellites ; en gras sont représentés les allèles dominants lorsque plus d’un allèle composait l’isolat.

^c Chaque isolats en identifié par un code international en fonction du pays probable d’infection (IVC: Côte d’Ivoire, UPV: Burkina Faso, GUI: Guinée, THA: Thaïlande) suivi du nombre de jour suivant le premier jour du traitement par atovaquone-proguanil (D0 correspondant à l’isolat au moment du diagnostic, avant traitement). La séquence en haut correspond à la séquence de référence la plus fréquemment retrouvée chez les isolats africains (Joy, Feng et al. 2003) et obtenu à partir du numéro d’accession Genbank n°AY282977.

Compte tenu de la diversité des génomes mitochondriaux et des marqueurs microsatellites chez les parasites en provenance d’Afrique de l’Ouest, la probabilité que deux parasites d’origine différentes mais portant le même génotype à l’exception de la mutation 268 se retrouvent chez le même patient était extrêmement faible. J’ai ainsi pu montrer que la mutation de résistance n’était pas transmise à l’Homme lors de la piqûre du moustique, mais qu’elle apparaît indépendamment chez chaque patient à partir d’une population parasitaire transmise par le moustique initialement sensible. Ceci expliquait pourquoi la mutation

était indétectable à J0. Cette mutation aurait ensuite été sélectionnée par le traitement pour conduire environ 20 jours plus tard, à un échec thérapeutique.

L'étude des relations entre les différents profils génétiques mitochondriaux des parasites mutants a confirmé l'évolution parallèle (ou convergente) des parasites mutants chez des patients différents (Figure 4). Ce phénomène est couramment décrit chez les bactéries et les virus mais c'était la première fois qu'il était mis en évidence chez *P. falciparum* pour des mutations associées à une résistance. Chez les plasmodies, ce phénomène avait été observé uniquement dans le cas de variations du nombre de copies du gène *pfmdr1* en lien avec la résistance à la méfloquine (Nair, Nash et al. 2007).

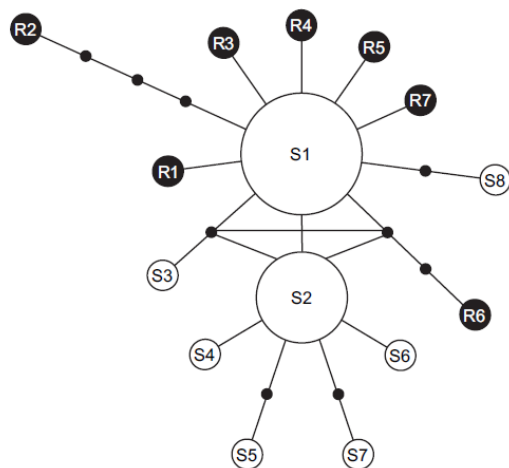


Figure 4. Réseau haplotypique des génomes mitochondriaux sensibles et résistants à l'atovaquone.

Les cercles blancs représentent les isolats sensibles à l'atovaquone-proguanil et les cercles noirs, les isolats résistants. Seules les variations neutres ont été considérées. Les petits points noirs représentent les étapes évolutives manquantes. Les isolats sensibles analysés ont été choisis en fonction de la provenance des isolats résistants étudiés. Ils étaient au nombre de 28.

P3. Musset L, Le Bras J, Clain J. Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol*, 2007. 24:1582-1585. IF n+2: 9.87. DOI: [10.1093/molbev/msm087](https://doi.org/10.1093/molbev/msm087).

2005. Au cours de ce travail, j'ai eu à effectuer mon premier co-encadrement d'un étudiant en master 1 en encadrant la réalisation de ses manipulations de biologie moléculaire et aidant à la rédaction de son mémoire de stage.

Origine évolutive des mutations du gène cytochrome *b* associées à la résistance à l'atovaquone-proguanil

Une fois l'évolution parallèle démontrée, nous avons cherché à savoir comment cette mutation est apparue chez le parasite et surtout comment elle s'est dispersée à l'ensemble des 20 copies du génome mitochondrial portées par chaque parasite. Ce que l'on observait chez les isolats provenant de patients en échec thérapeutique, c'est que ces derniers étaient toujours porteurs de parasites « tout mutant » (l'ensemble des copies du génome mutées) ou « non mutant » mais jamais de profils mixtes. Deux hypothèses ont donc été envisagées, soit la mutation était apparue spontanément chez le patient au cours de la multiplication clonale et au gré des erreurs de réplication, soit, comme cela a déjà été évoqué dans la littérature, l'atovaquone en elle-même procède un effet mutagène par production de radicaux oxygénés au moment de l'inhibition de la phosphorylation oxydative parasitaire (Srivastava, Morrissey et al. 1999).

En collaboration avec un biostatisticien, nous avons donc imaginé un modèle mathématique visant à prédire la diversité génétique mitochondriale générée par mutation aléatoire au cours de la phase d'expansion clonale érythrocytaire dans la population de parasites d'un patient puis à simuler l'effet de la pression médicamenteuse par atovaquone-proguanil sur ces mutations (Figure 5). L'objectif était de prédire l'évolution du nombre de copies mutées du gène impliqué (*pfcytb*), chez un même parasite, et au sein de la population parasitaire circulant chez un patient, au cours de la phase de multiplication asexuée érythrocytaire. Enfin, ces prédictions ont été confrontées aux données observées chez les patients pour voir quel cas de figure était le plus probable.

Ce modèle nous a ainsi permis de montrer que l'évolution de la résistance à l'atovaquone chez un patient passe par un chemin inattendu et original. En effet, avant le début du traitement initial, chaque patient est porteur d'un réservoir de parasites mutants généré *de novo* à partir de la population initiale sensible au cours de la forte expansion clonale et ce, par le biais d'erreur de réplication. Les mutants sont donc très fréquents. Cependant, la taille du réservoir de parasites mutants est très variable d'un patient à un autre. D'abord indétectables, les mutants sont ensuite sélectionnés au cours de la phase de multiplication asexuée avant d'être pour la plupart détruits, par les concentrations initialement élevées d'atovaquone ou, par le système immunitaire du patient lui-même. Cependant, certains patients ne parviennent pas à éliminer tous leurs

parasites mutants. Dans ce cas, ils présenteront un échec thérapeutique dit tardif, généralement entre 16 à 20 jours après le début du traitement.

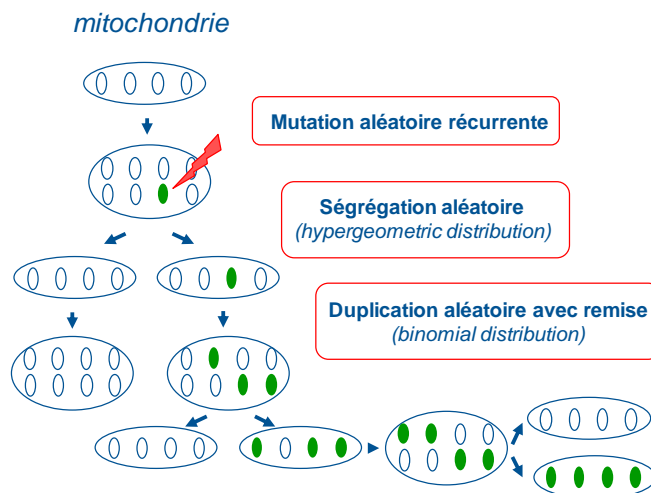


Figure 5. Principe du modèle utilisé.

Hypothèses testées : Apparition de la mutation selon la fréquence définie pour les plasmodies d'une mutation aléatoire à la position attendue. Trois fréquences ont été testées, 10^{-9} ; 10^{-10} et 10^{-11} . La ségrégation de cette mutation entre les différentes copies du génome a été calculée sur le processus de réplication de l'ADN propre à la mitochondrie proche de celui observé chez les bactériophages (Preiser, Wilson et al. 1996). La dispersion ou non de cette mutation à l'ensemble des copies du génome s'effectue par duplication aléatoire et dispersion à l'ensemble des copies selon la loi binomiale. Un taux de survie a été affecté aux parasites en fonction du nombre de copies mutantes portées par sa mitochondrie. Le nombre de copies du génome mitochondrial a également été testé selon différentes possibilités : 5, 10, 20 et 40 copies du génome.

P15. Cottrell G, Musset L, Hubert V, Le Bras J, Clain J. Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. 58: 4504-4514. IF n+2: 4.30. DOI: [10.1128/AAC.02550-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02550-13).

💡 L'ensemble de ces travaux de recherche sur l'atovaquone-proguanil ont permis de mettre en évidence l'émergence *de novo* de la résistance à l'atovaquone-proguanil chez le patient et de démontrer la présence de la mutation quasi systématique chez tous les patients, avant le début de leur traitement, sans pour autant être systématiquement à l'origine d'un échec thérapeutique. Ces travaux ont aussi permis de souligner l'importance des concentrations initiales plasmatiques en molécule qui peuvent avoir un rôle non négligeable dans l'émergence/sélection des parasites résistants à un antipaludique.

L'originalité de ce travail était également d'avoir mis en évidence ce phénomène, en amont de l'utilisation de l'atovaquone-proguanil en zone d'endémie et donc en amont de la sélection/dispersion des parasites résistants. Jusque-là, les travaux visant à comprendre l'histoire évolutive de l'apparition/dispersion de la résistance, à la chloroquine (Wootton, Feng et al. 2002) et la sulfadoxine-pyriméthamine (Cortese, Caraballo et al. 2002), avaient été réalisés de manière rétrospective faute d'outils de biologie moléculaire disponibles.

En termes de santé publique, ces résultats laissent craindre une sélection rapide de parasites résistants chez les patients suite à leur traitement. Par conséquent, si cette association devait être déployée en zone d'endémie, une dispersion rapide et massive de la résistance sous l'effet de la pression médicamenteuse serait attendue.

🔗 Autour de cette thématique, une perspective serait d'étudier la transmission des parasites mutants, résistants à l'atovaquone, chez le moustique. Ce projet pourrait bénéficier des isolats de terrain adaptés à la culture cellulaire dont nous disposons à Cayenne mais également à Paris. Il s'agit de couple d'isolats, J0 sensibles et non mutants et Jx résistants et mutants *pfcytb* 268 que nous avons isolés des patients infectés en Amérique du Sud (n=4) ou en Afrique (effectif à déterminer). Il serait pertinent d'étudier leur transmission chez la souris humanisée *via* leur vecteur régional, respectivement, *Anopheles darlingi* ou *Anopheles gambiae*. Pour ce faire, une demande de financement co-construite avec mes collègues de l'unité Mère/Enfants face aux infections tropicales (UMR2016 IRD - Université Paris Descartes) et du CNR paludisme à Paris a déjà été évoquée.

Le gène *pfcr* : marqueur de résistance à la chloroquine mais pas que....

Contrairement à la résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone-proguanil qui implique une mutation unique au niveau du gène *pfcytb*, la résistance à la chloroquine est, elle, liée à la présence de nombreuses mutations au niveau d'un gène codant un transporteur vacuolaire, *pfcr* (chloroquine resistant transporter). Ce gène a été identifié à la fin des années 90 (Fidock, Nomura et al. 2000). C'est une combinaison de mutations qui est décrite comme étant responsable de la résistance à la chloroquine (Figure 6).

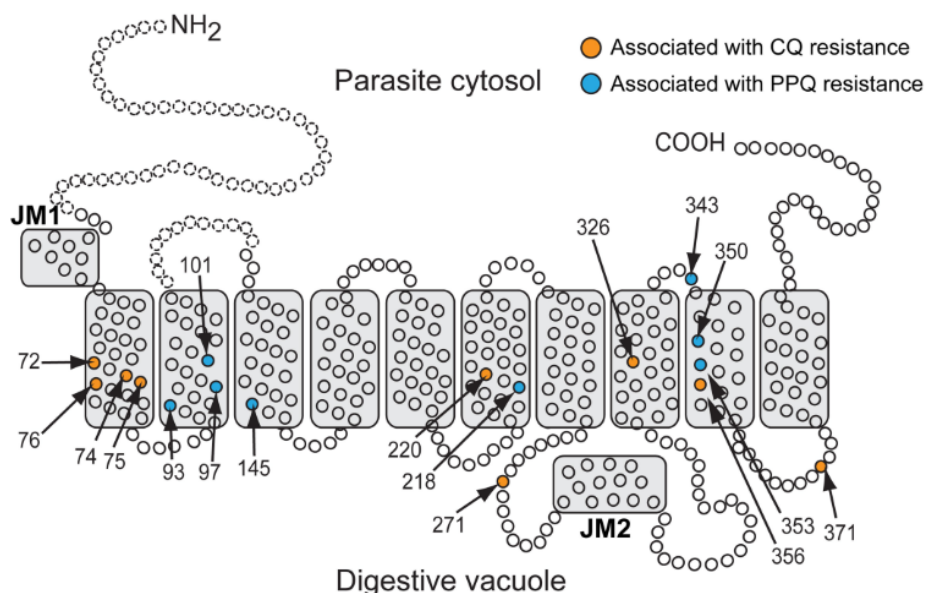


Figure 6. Mutations PfCRT impliquées dans la résistance à la chloroquine ou à la pipéraquline.

En orange les positions clés de la résistance à la chloroquine ; en bleu celles de la résistance à la pipéraquline.

Kim, Tan et al. 2019

A la suite de l'identification de ce gène, de nombreux isolats provenant des différentes zones d'endémie ont été séquencés et ont permis de mettre en évidence une grande variabilité d'allèles au niveau du gène *pfcr* en fonction de leur origine géographique (Tableau 2, (Fidock, Nomura et al. 2000, Chen, Kyle et al. 2003, Durrand, Berry et al. 2004). Au total, 17 résidus sont potentiellement polymorphes. Les isolats résistants présentent chacun des allèles comportant de quatre à neuf mutations ponctuelles situées dans, ou à proximité, des régions potentiellement transmembranaires de PfCRT (Tableau 2). Ils ont cependant tous en commun d'être mutés en position 76, K76T.

Tableau 2. Allèles *pfcr* observés en fonction de l'origine géographiques des isolats de *P. falciparum*.

Souche	Origine	Position PfCRT en acide aminé															
		72	74	75	76	97	144	148	160	194	220	271	326	333	350	356	371
3D7	Afrique	C	M	N	K	H	A	L	L	I	A	Q	N	T	C	I	R
7G8	Amérique du Sud	S	M	N	T	H	A	L	L	I	S	Q	D	T	C	L	R
Ecu1110	Equateur	C	M	N	T	H	A	L	L	I	S	Q	D	T	C	L	R
Dd2	Afrique	C	I	E	T	H	A	L	L	I	S	E	S	T	C	T	I
Camb734	Cambodge	C	I	D	T	H	F	I	L	T	S	E	N	S	C	I	R
PH2	Philippines	S	M	N	T	H	T	L	Y	I	A	Q	D	T	C	I	R

Cette diversité des allèles en fonction des zones géographiques a permis de retracer l'histoire évolutive de ce marqueur. En effet, les parasites résistants à la chloroquine ont émergés de façon indépendante mais quasi-simultanée dans différentes régions du monde, essentiellement en Asie du Sud-Est, Papouasie Nouvelle Guinée et Amérique du Sud avant de coloniser l'ensemble des zones d'endémie y compris africaines sous l'effet de la pression médicamenteuse (Awasthi and Das 2013).

Chemin évolutif pour aboutir à l'allèle équatorien du gène *pfcr*

Porteurs de projet : D. Fidock

Collaboration : C. Modchang, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Financement : NIH R01

Un de mes premiers objectifs au cours de mon postdoctorat dédié à l'étude de *pfcr* était de retracer le chemin évolutif ayant abouti à l'allèle équatorien (Ecu 1110, K76T-A220S-N326D-I356L). C'est le faible nombre de mutations de cet allèle, quatre, qui nous a orienté vers cet haplotype (Tableau 2). Pour ce faire, nous avons modifié génétiquement une souche de référence sensible à la chloroquine, GC03 d'haplotype *pfcr* 3D7, par recombinaison homologue après avoir généré les 16 plasmides regroupant toutes les combinaisons de mutations possibles. Chaque allèle ne variait du précédent qu'au niveau d'une seule position.

Pour mener à bien ce projet, j'ai utilisé une technique de recombinaison allélique qui nécessitait l'incorporation préalable d'une séquence cible de quelques paires de bases (AttB) dans les parasites à modifier. Une fois cette séquence intégrée, une deuxième transformation, rapide et ciblée cette fois au niveau de la séquence AttB, était requise (Nkrumah, Muhle et al. 2006). Dans un premier temps, il a fallu déterminer la meilleure position de la séquence AttB au sein des régions codantes. Elle a finalement été positionnée au niveau de l'intron 1 de *pfcr*, assez éloignée des extrémités introniques pour ne pas gêner l'épissage des ARNm puis l'expression de la protéine (Figure 7).

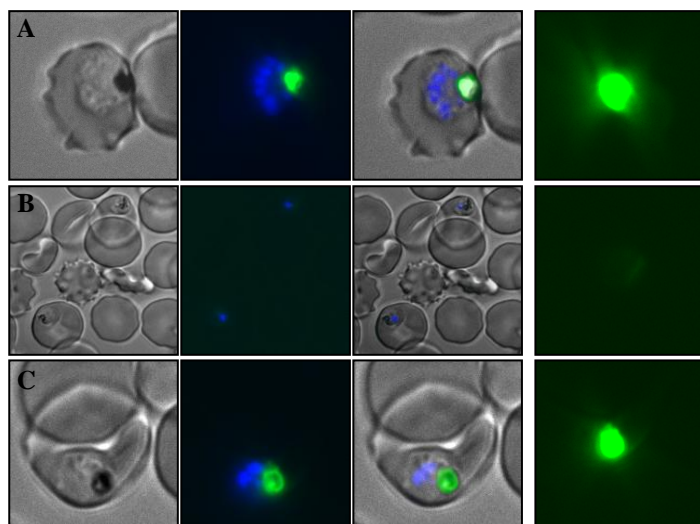


Figure 7. Impact de la séquence AttB sur l'expression du gène *pfcr* marqué à la GFP.

A. Expression contrôlée sans séquence AttB ;
B. Séquence positionnée à la fin de l'intron 1 ;
C. Séquence positionnée à 30pb de l'extrémité 5' de l'intron 1.

La transfection de trois souches de référence m'a permis d'obtenir une intégration de la séquence AttB dans une souche. Malheureusement, cette transformation avait intégré deux copies du plasmide. De ce fait, lors de la deuxième intégration, le risque était que l'haplotype *pfcr* s'intègre dans la région non exprimée du génome. J'ai dû quitter ce projet en cours pour rejoindre l'Institut Pasteur de la Guyane. Les parasites isogéniques ont cependant été générés par un autre post-doctorant. L'analyse des phénotypes de sensibilité à la chloroquine et du profil de croissance *in vitro* des différents transfectants ont permis de modéliser le chemin évolutif le plus probable ayant permis d'aboutir à Ecu 1110 et à la résistance à la chloroquine. Les résultats ont montré une apparition tardive de la mutation K76T alors que la mutation ayant le plus d'impact, seule, en termes de niveau de sensibilité était la mutation N326D. Seule l'association des quatre mutations permet d'aboutir à un niveau de résistance considérable. Compte tenu des profils de résistance observés, il semblerait que ce chemin évolutif ait été largement sous l'influence du métabolite de la chloroquine, la monodéséthyl-chloroquine, et de l'amodiaquine, un antipaludique utilisé en même temps que la chloroquine dans les années 50-60.

P25. Gabryszewski SJ, Modchang C, **Musset L**, Chookajorn T, Fidock DA. Combinatorial genetic modeling of *pfcr*-mediated drug resistance evolution in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, 2016. 33: 1554-1570. IF n+2: 10.22. DOI: [10.1093/molbev/msw037](https://doi.org/10.1093/molbev/msw037).

Génotype *pfCRT* et phénotype de résistance à la chloroquine : importance du fond génétique parasitaire

Porteur de projet : D. Fidock

Financement : NIH R01

Le deuxième objectif de mon post-doctorat était de comprendre l'implication de l'haplotype sud-américain 7G8 dans le niveau de résistance des parasites à la chloroquine en fonction du fond génétique parasitaire. En d'autres termes, le génotype *pfCRT* est-il l'unique déterminant génétique de la résistance à la chloroquine ? Pour ce faire, plusieurs souches de référence sensibles (3D7 africaine, D10 de Papouasie Nouvelle Guinée et GC03), possédant des fonds génétiques variables ont été génétiquement modifiées au niveau de ce gène. Ce travail nous a permis de montrer que le gène *pfCRT* mutant, introduit dans une souche de référence sensible, induit des niveaux de réponse *in vitro* très variables allant de la résistance nette à la tolérance uniquement (Figure 8). La tolérance est ici caractérisée par une concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) inchangée, c'est-à-dire sensible, mais une CI₉₀ nettement augmentée.

P6. Valderramos S, Valderramos JC, Musset L, Purcell L, Mercereau-Pujalon O, Legrand E, Fidock D. Identification of a Mutant PfCRT-Mediated Chloroquine Tolerance Phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLOS Path.* **2010.** 6: epub. *IF n+2:* 8.14. DOI: [10.1371/journal.ppat.1000887](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000887).

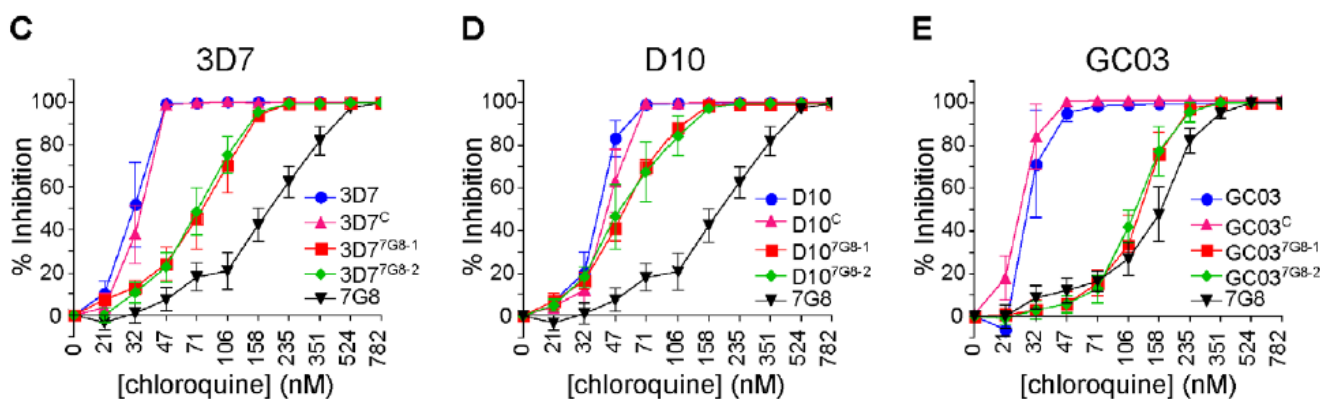


Figure 8. Sensibilité *in vitro* à la chloroquine de 3D7, D10 et GC03 exprimant l'haplotype *pfCRT* 7G8.

Les courbes bleues représentent les courbes effet/dose des souches non modifiées, les courbes roses des souches modifiées par le génotype contrôlé 3D7, les courbes rouges et vertes deux clones distincts exprimant le génotype *pfCRT* de résistance 7G8. Les courbes noires représentent la souche de référence 7G8 non modifiée.

Le retour de la sensibilité à la chloroquine en Guyane : une histoire évolutive originale chez *Plasmodium falciparum*

Porteur de projet : L. Musset.

Collaborations : D. Neafsey, Broad Institute, Cambridge, USA

D. Fidock, Département de Microbiologie, Université Columbia, New-York City, USA

Financement : Santé Publique France, ANR CEBA (Oemarquine, PlasmodynEvol), STRonGer FP7.

Ma prise de poste en tant que responsable adjointe du laboratoire de parasitologie à Cayenne m'a permis de poursuivre ce travail autour de *pfCRT* et de continuer à travailler en collaboration avec Columbia University, d'un côté sur des souches de référence et de l'autre sur des isolats de terrain. En effet dans le même temps, l'équipe du laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane (IPG) observait chez les isolats de Guyane, l'allèle 7G8 (72S, 76T, 220S, 326D et 356L) de *pfCRT* prédominant, voire fixé dans la population parasitaire alors que 70% des isolats étaient sensibles *in vitro* à la chloroquine.

Deux hypothèses étaient envisageables pour expliquer l'absence de résistance à la chloroquine en présence de la mutation *pfCRT* 76T. La première était que la mutation *pfCRT* K76T est nécessaire mais pas suffisante pour conférer la résistance. Cette première hypothèse permettait d'expliquer les contradictions observées lors d'études épidémiologiques de terrain (Basco and Ringwald 2001, Thomas, Ndir et al. 2002). La seconde était qu'un phénomène de réversion de la résistance, permettant d'améliorer la valeur sélective des parasites, aurait eu lieu en Guyane à la suite de la diminution de la pression médicamenteuse par la chloroquine.

La première phase de ce travail a consisté à adapter à la multiplication *in vitro* des isolats de terrain, de les cloner puis de les caractériser génotypiquement (analyse génome entier) et phénotypiquement (test de chimiosensibilité *in vitro*). Au total, 54 isolats ont été séquencés et 35 d'entre eux ont été inclus dans une étude d'association pangénomique qui a permis d'associer de façon robuste une mutation au niveau de *pfcr*, C350R, avec le niveau de sensibilité à la chloroquine (Figure 9A). De façon à valider biologiquement ce marqueur, cette mutation a été introduite dans une souche de référence brésilienne génétiquement proche des isolats circulants en Guyane, 7G8 (Figure 9B). Une étude rétrospective portant sur 573 échantillons collectés en Guyane entre 1998 et 2014 et conservés dans notre collection d'ADN du CNR a alors été menée (Figure 9C). Cette dernière a permis de montrer que les parasites porteurs de cette mutation sont apparus en 2003 avant de rapidement diffuser à l'ensemble de la population parasitaire guyanaise (Figure 9D).

C'est donc bien un phénomène de réversion de la résistance qui a eu lieu par l'intermédiaire d'une mutation ponctuelle compensatoire, C350R. Nous avons à cette époque émis l'hypothèse de cette mutation ayant été sélectionnée car elle permettait d'améliorer la valeur sélective des parasites en présence d'une faible pression médicamenteuse par la chloroquine.

P8. Legrand E, Yrinesi J, Ekala MT, Peneau J, Volney B, Berger F, Bouchier C, Bertani S, **Musset L**, Meynard JB, Puijalon O. Discordant temporal evolution of *Pfcr* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium falciparum in vitro* drug susceptibility to 4-aminoquinolines after changing drug policy in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2012**. 56: 1382-1389. IF n+2: 4.48. DOI: [10.1128/AAC.05280-11](https://doi.org/10.1128/AAC.05280-11).

P21. Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkmand SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA*, Neafsey DE* & **Musset L**. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: reversal of chloroquine resistance by acquisition of a novel *pfcr* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2015**. 112: 11672-11677. IF n+2: 9.66. DOI: [10.1073/pnas.1507142112](https://doi.org/10.1073/pnas.1507142112).

2011-2015. Ce travail a été effectué avec l'implication d'un post-doctorant et d'une étudiante en master 1.

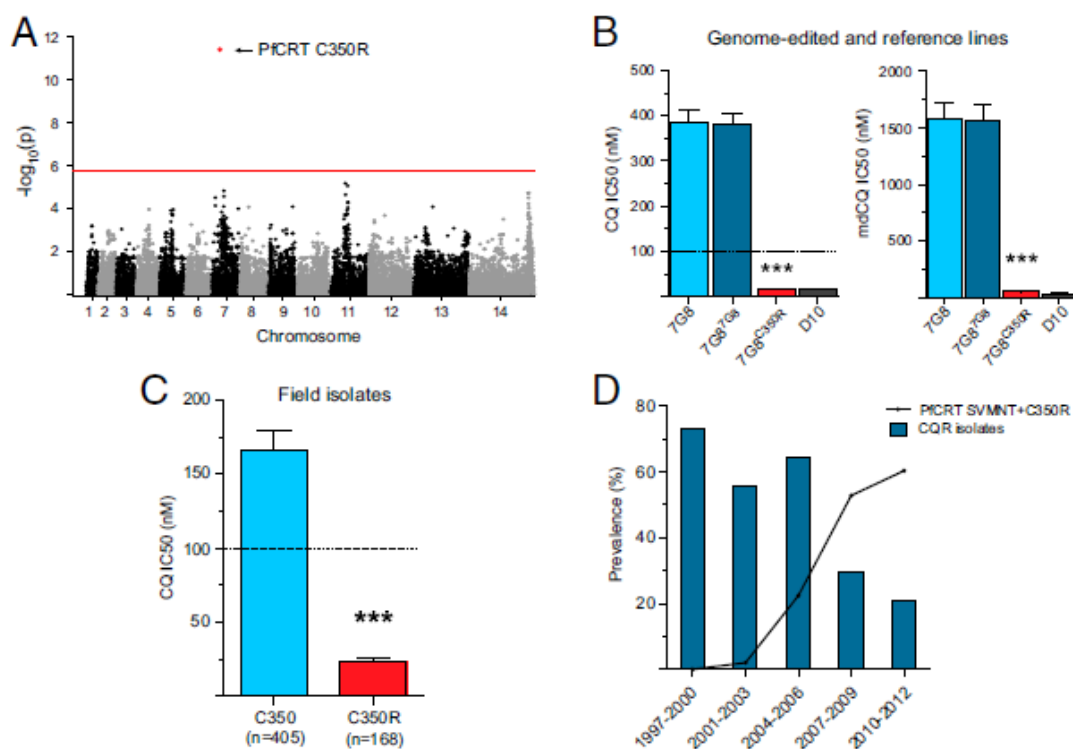


Figure 9. Réversion de la résistance à la chloroquine en Guyane, caractérisation et temporalité.

A. Manhattan plot mettant en évidence l'association de la mutation *pfcr* C350R et le phénotype de sensibilité à la chloroquine (n=35 génomes). **B.** Validation biologique de l'association génotype/phénotype par modification génétique homologue d'une souche de référence sud-américaine 7G8. *** p<0,0001. Seuil *in vitro* de résistance à la chloroquine : 100nM. **C.** Etude rétrospective de 573 isolats collectés en Guyane en fonction de leur sensibilité *in vitro* à la chloroquine. ***p<0,0001. Seuil *in vitro* de résistance à la chloroquine : 100nM. **D.** Diminution de la prévalence des parasites résistants à la chloroquine de manière inversement proportionnelle à la prévalence de la mutation *pfcr* C350R en Guyane entre 1997 et 2012.

TRACQSA: Tracking the spread of CQR reversion in South America through the mutation C350R of *pfcr*

Porteur du projet : L. Musset

Collaborations : Marcello Ferreira, University de Sao Paulo
Marcus Lacerda, Fondation de Médecine Tropicale, Manaus
Horace Cox, Programme national de lutte contre le paludisme, Guyane
Malti Adhin, Faculty of Medical Science, Paramaribo, Suriname
Dionicia Gamboa, Universidad peruana cayetano Heredia, Pérou
Herrera Socrates, CICAC, Cali, Colombie.

Financements : ANR CEBA (Oemarquine, PlasmoDynEvol)

À la suite de l’identification de cette mutation, une étude rétrospective portant sur des isolats collectés entre 2013 et 2015 a cherché à évaluer la répartition géographique de cette nouvelle mutation à l’échelle continentale. Il semblerait que cette mutation soit spécifique du plateau des Guyanes (Figure 10).

Une analyse de la diversité génétique autour du marqueur *pfcr* a été initiée mais non finalisée pour l’instant de façon à déterminer l’origine des révertants.

2013-2015. Ce travail a été effectué en collaboration avec quatre étudiants, deux, niveau master 2 et deux, niveau BTS accueillis au laboratoire.

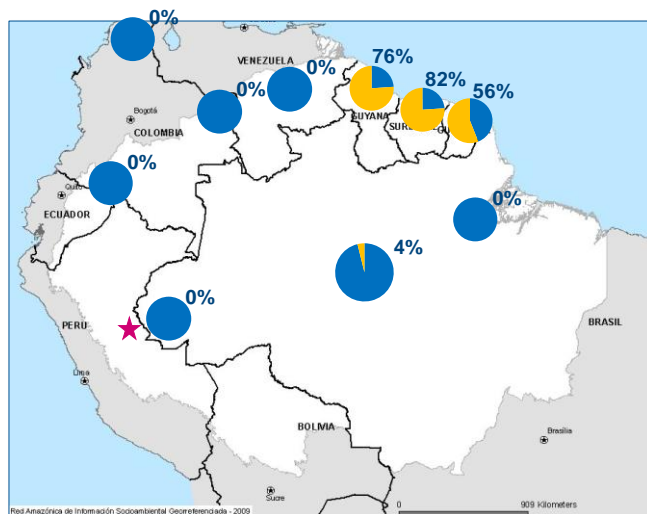


Figure 10. Répartition de *pfcr* C350R en Amazonie.

Déploiement de l’Eurartésim® en Guyane, des échecs thérapeutiques et, ... *pfcr* ?

Porteurs du projet : L. Musset, F. de Laval Service de Santé des Armées

Collaboration : N. Taudon, IRBA Brétigny sur Orge

Financement : Santé Publique France


En 2011, l’Eurartésim®, association de dihydro-artémisinine et pipéraquline, obtient son AMM en Europe et son remboursement en France en 2014. Ainsi, en 2016, le 3^{ème} Régiment d’Etranger d’Infanterie (REI) basé à Kourou, commence à l’utiliser pour traiter les légionnaires infectés par *P. falciparum* de retour des zones orpaillées où ils luttent contre l’orpaillage clandestin.


Le Centre National de Référence, en collaboration avec le service de santé des armées, a mis en place un suivi systématique des militaires sous traitement. Entre 2016 et 2018, sept patients ont été traités par Eurartésim® et quatre ont présenté des recrudescences parasitaires entre J22 et J30 malgré un traitement déclaré bien suivi.

Les dosages plasmatiques ont permis d’identifier trois cas de résistance parasitaire à la pipéraquline. Le nombre de copies du gène de la plasmepsine, connu pour être impliqué dans le mécanisme de résistance à la pipéraquline en Asie du Sud-Est (Witkowski, Duru et al. 2017), ne montrait pas d’association particulière avec la résistance. Les trois isolats associés aux échecs thérapeutiques portaient la mutation *pfcr* C350R et pour deux d’entre eux, étaient résistants *in vitro* à la pipéraquline en utilisant la nouvelle méthode de phénotypage PSA (Piperaquine Survival Assay).


Ces résultats décrivent pour la première fois des échecs thérapeutiques à un ACT en Amérique du Sud liés à une résistance de la molécule partenaire, la pipéraquline, sans résistance associée à l’artémisinine (tests RSA sensibles et *pfk13* non mutant).


P ? Sauthier S, de Laval F, Morin F, Taudon N, Musset L. Dihydroartemisinin-Piperaquine treatment failures in absence of *pfk13* mutation but associated with *Plasmodium falciparum* *in vitro* resistance to Piperaquine in Amazonia. En cours de préparation.

 **2018-2019.** Ce travail de caractérisation et de rédaction d'une première correspondance a été effectué en lien avec une étudiante de niveau licence/master 1.

 D'après ces résultats préliminaires, il semblerait que la mutation C350R de *pfcr*, initialement décrite comme impliquée dans la réversion de la résistance à la chloroquine, ait été finalement sélectionnée lors de l'utilisation de la pipéraquline. Ces résultats vont également dans le sens des dernières publications parues sur la structure de la protéine PfCRT (Kim, Tan et al. 2019). Cette publication décrit au niveau atomique le mécanisme de résistance à la chloroquine et la pipéraquline de *pfcr* en lien avec les mutations identifiées à travers le monde, notamment en Asie. Ainsi, l'introduction d'une arginine en position 350 réduit la charge négative au sein de la cavité et diminue son affinité pour la pipéraquline.

La pipéraquline est utilisée par les orpailleurs depuis le début des années 2000 car ils s'automédiquent avec de l'Artecom[®], une trithérapie non recommandée qui associe, dihydro-artémisinine, pipéraquline et triméthoprime. Au sein du laboratoire, une postdoctorante explore actuellement cette question du lien entre la mutation *pfcr* C350R et la résistance à la pipéraquline en tentant de générer des lignées isogéniques *pfcr* C350R sauvages ou mutantes dans des isolats de Guyane et en analysant le génome de parasites PSA sensible ou résistant pour confirmer ou non l'implication, seule ou associée à d'autres marqueurs, de cette mutation. Concernant l'amplification des gènes plasmepsine 2 et 3, les résultats préalablement obtenus laissent penser que ce n'est pas le principal marqueur de la résistance à la pipéraquline en Guyane (Witkowski, Duru et al. 2017). Si l'implication de *pfcr* se confirme, les résultats obtenus mais non valorisés dans le cadre de l'étude TRACQSA seront exploités à ce moment là de façon à renforcer la publication à venir. Par ailleurs, sur la base des différents génomes entiers dont nous disposons pour des isolats de Guyane et du Guyana, nous tenterons de comprendre si l'émergence de cette résistance est unique ou multiple sur le plateau des Guyanes.

 **2015-2018.** Les données préliminaires plasmepsine ont été obtenues avec l'aide de quatre étudiants, un étudiant en 3^{ème} année de pharmacie, deux en 3^{ème} année d'école d'ingénieur et un en 2^{ème} année de licence. Ils ont été chacun impliqués dans la mise au point de la méthode ou l'analyse séquentielle d'échantillons.

 Ce travail sur le *pfcr* gène a débuté dans le simple but d'approfondir nos connaissances sur ce gène puisque la chloroquine n'était déjà plus utilisée pour traiter *P. falciparum*. L'objectif était, entre autres, de comprendre le chemin évolutif pris par le parasite pour aboutir aux allèles de résistances qui circulent actuellement dans le monde. Cependant, de fil en aiguille, nos résultats nous orientent vers d'autres molécules, généralement de la même famille mais qui sont quant à elles d'actualités et utilisées en thérapeutique. Cette protéine vacuolaire, PfCRT par laquelle passent de nombreux antipaludiques n'a pas encore fini de nous étonner.

Résistance aux dérivés de l'artémisinine, REAGIR si l'histoire se répète

♦ En 2001, les associations à base de dérivés de l'artémisinine ont été déployées et recommandées par l'OMS comme première ligne de traitement des accès à *P. falciparum*. Ces associations de deux antipaludiques présentent l'avantage de retarder la sélection de parasites résistants grâce à la diminution rapide de la biomasse parasitaire liée à l'action immédiate de l'artémisinine (White 1997). Cette action rapide (10 000 fois moins de parasites en 48h) a été mise à profit avec l'autorisation d'administrer dans les cas graves de l'artésunate en intraveineux. Cela a permis de réduire le nombre de décès par neuropaludisme (Talman, Clain et al. 2019). En Guyane, c'est en 2007 que la première association à base d'artémisinine a été déployée, le Riamet[®], une association d'artéméther et de luméfantrine. Elle a été rejointe en 2016 par l'Eurartésim[®].

La demi-vie courte des artémisinines, qui plus est, associée à une autre molécule, ne laissait pas présager une sélection de parasites résistants rapide. Cependant, c'est en 2008 qu'au Cambodge les premiers signes de diminution de sensibilité ont été décrits (Noedl, Se et al. 2008). Cette diminution de sensibilité se traduisait par un retard de clairance parasitaire mesurable en prélevant le patient régulièrement (toutes les 6 à 8 heures) pour déterminer la parasitémie et calculer le temps de clairance parasitaire. Ce retard de clairance se traduisait également par une parasitémie encore positive trois jours après le début du traitement. La définition actuelle de l'OMS de la résistance à l'artémisinine correspond donc à un retard de clairance parasitaire après un traitement par l'artésunate en monothérapie ou après un traitement par une ACT (World Health Organization 2018d). Cette résistance est dite partielle car la majorité des patients, même infectés par des parasites dits résistants, est capable de les éliminer après traitement. Elle est dite partielle aussi car elle n'affecte que les parasites au stade ring. Ainsi, *in vitro*, une nouvelle méthode de phénotypage, le test RSA (Ring Survival Assay), a été mise au point pour la mesurer (Witkowski, Amaratunga et al. 2013). Elle utilise des parasites synchronisés au stade ring, dans une fenêtre de temps très courte, entre 0 et 3h. Elle peut être réalisée assez facilement sur des échantillons fraîchement prélevés (méthode *ex vivo*) ou avec beaucoup de contraintes horaires sur des isolats adaptés à la multiplication *in vitro* (méthode *in vitro*). C'est l'utilisation de cette méthode qui a permis en 2014 d'identifier un marqueur moléculaire de résistance aux artémisinines en Asie du Sud-Est, des mutations ponctuelles, généralement uniques, présentes au niveau de la région propeller du gène *pfk13* (Ariey, Witkowski et al. 2014). Rapidement après son identification, l'épidémiologie de ce gène a commencé à être décrite dans le monde (📖 P28).

Sur le plateau des Guyanes, l'année 2013 a été marquée par une alerte liée à l'identification de patients présentant des retards de clairance parasitaire, 31% et 57% respectivement, au Suriname et au Guyana (Vreden, Jitan et al. 2013). Bien que la qualité des lectures faites à J3 puisse être discutée, nous avons en 2015 identifié la mutation *pfk13* C580Y, marqueur majoritaire de résistance en Asie du Sud-Est (WHO 2018), chez des isolats collectés au Guyana en 2010 (📖 P24).

Dans ce contexte, il nous est apparu fondamental de maîtriser les dernières techniques de phénotypage par RSA au laboratoire. Nous maîtrisons déjà la modification génétique des plasmodies par recombinaison homologe et disposons d'une collection d'isolats de parasites adaptés à la multiplication *in vitro* importante. Sur cette base, nous avons développé un nouvel axe de recherche visant à : i) caractériser dans le temps et dans l'espace le gène *pfk13* sur le plateau des Guyanes, ii) valider certaines mutations du gène *pfk13* comme marqueur de résistance dans la région et, iii) étudier le fitness des parasites mutants *pfk13* en Amazonie.

📖 P24. Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, Krishnalall K, Ceron N, Musset L, Macedo de Oliveira A, Venkatesan M, Rahman R, Barnwell JW, Udhayakumar V. Independent Emergence of the *Plasmodium Falciparum* Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis.* **2015.** 213: 1472-1475. *IF n+2*: 5.19. DOI: [10.1093/infdis/jiv752](https://doi.org/10.1093/infdis/jiv752).

Préambule au sujet du projet européen ELIMALAR

Porteur de projet :	L. Musset
Collaborations :	E. Mosnier, Centres Délocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne
	F. Djossou, Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de Cayenne
Budget global :	1 159 335€
Financements :	FEDER Europe 586 014€, ARS Guyane 94 118€, Rotary Club International 65 172€, OMS 15 946€, Hôpital de Cayenne et Ministère de la recherche.

Ce projet collaboratif de recherche en santé publique, innovant et fort de complémentarité entre ses acteurs, vise à évaluer différentes approches/outils pour améliorer la lutte contre le paludisme sur le Plateau des Guyanes et tendre le plus rapidement possible vers son élimination. Il a pour finalité d'orienter et d'accompagner les décideurs en santé publique au passage de la phase de contrôle de la maladie à une phase d'élimination du paludisme en Guyane. Ce changement de phase implique de cibler les patients asymptomatiques porteurs de parasites dans les poches résiduelles de transmission afin de la stopper définitivement. Que les approches soient ciblées ou généralistes, elles reposent sur des méthodes diagnostiques performantes et des traitements fiables et efficaces.

Ainsi, ce projet inclut deux axes :

1. **REAGIR** : Résistance/Emergence aux Artémisinines et ses partenaires sur le plateau des Guyanes, les Identifier pour mieux les faire Reculer. Ces associations sont aujourd'hui recommandées dans le monde entier y compris sur le plateau des Guyanes pour traiter les patients mais, sont-elles toujours efficaces et si oui, pour combien de temps ?
2. **PALUSTOP** : pour définir si la mise en place d'un dépistage actif ciblé associé à un traitement de toutes les personnes positives vivant dans une zone de transmission en Guyane est efficace et réalisable.

J'expose ce projet avant de détailler l'axe REAGIR dans le détail car il inclut une grande partie de mes activités de recherche ces dernières années et est structurant pour le laboratoire puisqu'il apporte des ressources non négligeables. Initié dès 2015, le montage administratif de ce projet s'est révélé complexe et chronophage. Administrativement, il a d'ailleurs pris beaucoup de retard et est aujourd'hui prolongé jusqu'en décembre 2021. Il a débuté scientifiquement en septembre 2017 autour de l'axe PALUSTOP (cf p. 71) et en janvier 2017 concernant l'axe REAGIR.

Résistance de *P. falciparum* aux artémisinines au Guyana, un site d'émergence made in Amazonie

Porteur du projet :	L. Musset
Collaborations :	Vector Control Program, Ministère de la Santé, Georgetown, Guyana D. Fidock, Columbia University Medical Center, New York, USA D. Neafsey, Harvard University, Boston, USA K Udhayakumar, Malaria branch, CDC, Atlanta, USA
Financements :	OMS, FEDER ELIMALAR, ARS Guyane, Ministère de la recherche

En 2016-2017, nous avons analysé 854 isolats en provenance du Guyana parmi lesquels nous avons identifié 14 mutants *pfk13* C580Y soit 1,6% IC₉₅ [6,73 – 21,27]. Les mutants étaient retrouvés préférentiellement dans la région administrative n°1 (Région 1) à la prévalence moyenne de 8,8%, pouvant atteindre 20% certains mois de l'année (Figure 11A). Cette région est une zone minière du Guyana où l'utilisation des antipaludiques est parfois aléatoire et peut inclure des monothérapies à base de dérivés d'artémisinine. Une analyse des marqueurs microsatellites autour de *pfk13* a été réalisée pour 13 de ces mutants. Les résultats ont montré une origine commune et identique aux mutants de 2010, Guyana A et Guyana B (Figure 11B).

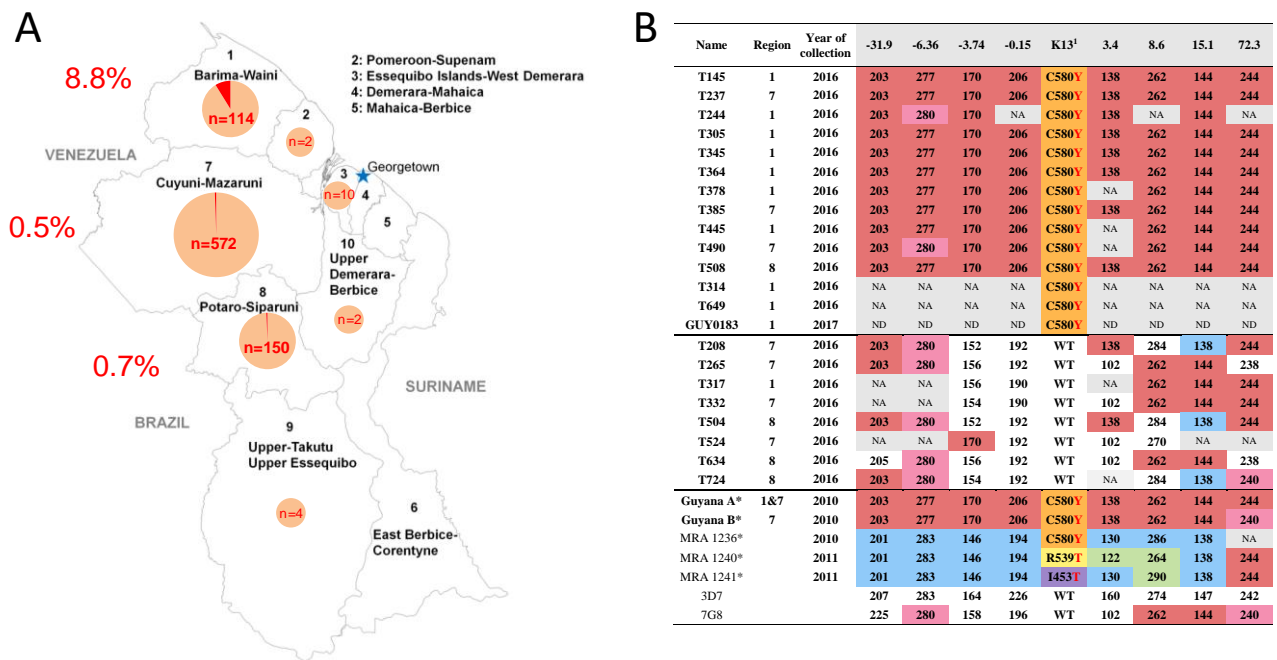


Figure 11. Mutation *pfk13* C580Y au Guyana, 2016-2017, répartition (A) et origine (B).

A. Prévalence des mutants observés dans les Régions 1, 7 et 8 du Guyana en fonction du nombre total d'isolats analysés. **B.** Analyse des marqueurs microsatellites autour de *pfk13* des mutants 2016-2017 en comparaison des mutants 2010 du Guyana, haplotypes A et B (Chenet, Akinyi Okoth et al. 2016) et des mutants cambodgiens (MRA). ¹Région propeller du gène analysée: codons 438-704. Position des marqueurs microsatellites exprimée en kilobase en amont ou en aval du gène *pfk13*. NA: Pas d'amplification, ND: Non réalisé.

Un séquençage du génome entier de 53 de ces isolats incluant 13 mutants et 3 à 4 isolats non mutants appariés dans le temps et dans l'espace aux mutants a permis de mettre en évidence une émergence indépendante de celle d'Asie du Sud-Est ainsi qu'une expansion clonale de ces derniers (Figure 12A).

Pour confirmer ou non l'implication de cette mutation dans la résistance aux artémisinines chez des isolats sud-américains, elle a été, ainsi que la mutation R539T, insérée dans deux isolats de Guyane (O141-A année 2011 et R086 année 2014) en utilisant la méthode des nucléases à doigts de zinc (Zinc-Finger Nuclease (ZFN)). R539T avait été choisi car c'était le phénotype de résistance le plus marqué chez les isolats du sud-est asiatique et C580Y parce que nous l'avions identifié au Guyana (Chenet, Akinyi Okoth et al. 2016). Des lignées isogéniques ont ainsi été générées et clonées avant d'être phénotypées par RSA. La présence des mutations C580Y ou R539T dans le gène *pfk13* des isolats guyanais confère une résistance marquée *in vitro* aux dérivés de l'artémisinine avec des valeurs de survie respectivement de 0,6% ±0,2 pour R086 et 13,7% ±1,5 pour R086^{C580Y} ($p=0,006$), 0,5% ±0,1 pour O141-A et 27,6% ±7,0 pour O141-A^{C580Y} ($p=0,03$) ou encore 0,6%±0,2 contre 33,0% ±5,0 chez R086^{R539T} ($p=0,011$) (Figure 12B). Pour mémoire, le seuil de diminution de sensibilité pour l'interprétation des tests RSA, dit de survie, est fixé à 1%.

Pour analyser l'impact de ces mutations sur le fitness des parasites, des tests de compétition de croissance ont été réalisés entre les lignées parentales et mutées. Ces tests consistaient à mélanger à J0 une même proportion des parasites mutés et leurs parents afin de suivre l'évolution de la composition de la culture tous les deux jours pendant 60 jours. Les tests ont été réalisés en duplicat et deux fois de suite. La proportion des parasites mutants contenus dans la culture a été déterminée par PCR en temps réel tous les deux jours. Les résultats de ces tests montraient une baisse de la proportion des mutants au fil des cycles de multiplication (Figure 12C). Cette diminution était plus marquée pour la mutation C580Y intégrée dans l'isolat O141-A. La différence de fond génétique entre O141-A et R086 pouvait expliquer cette différence d'impact d'une même mutation sur la croissance des parasites. Quoiqu'il en soit, la mutation C580Y avait un impact significativement négatif sur la multiplication parasitaire comparé aux parasites sauvages (Figure 12D). Cet impact était compris entre -0,6 et -1,3% par génération.

P43 Mathieu L, Cox H, Early A, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Ade MP, Lucchi N, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre J, Demar M, Ringwald P, Neafsey D, Fidock D, **Musset L.** Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. *Elife*. 2020. 9 :e51015. IF n-1: 6.83. doi: [10.7554/eLife.51015](https://doi.org/10.7554/eLife.51015).

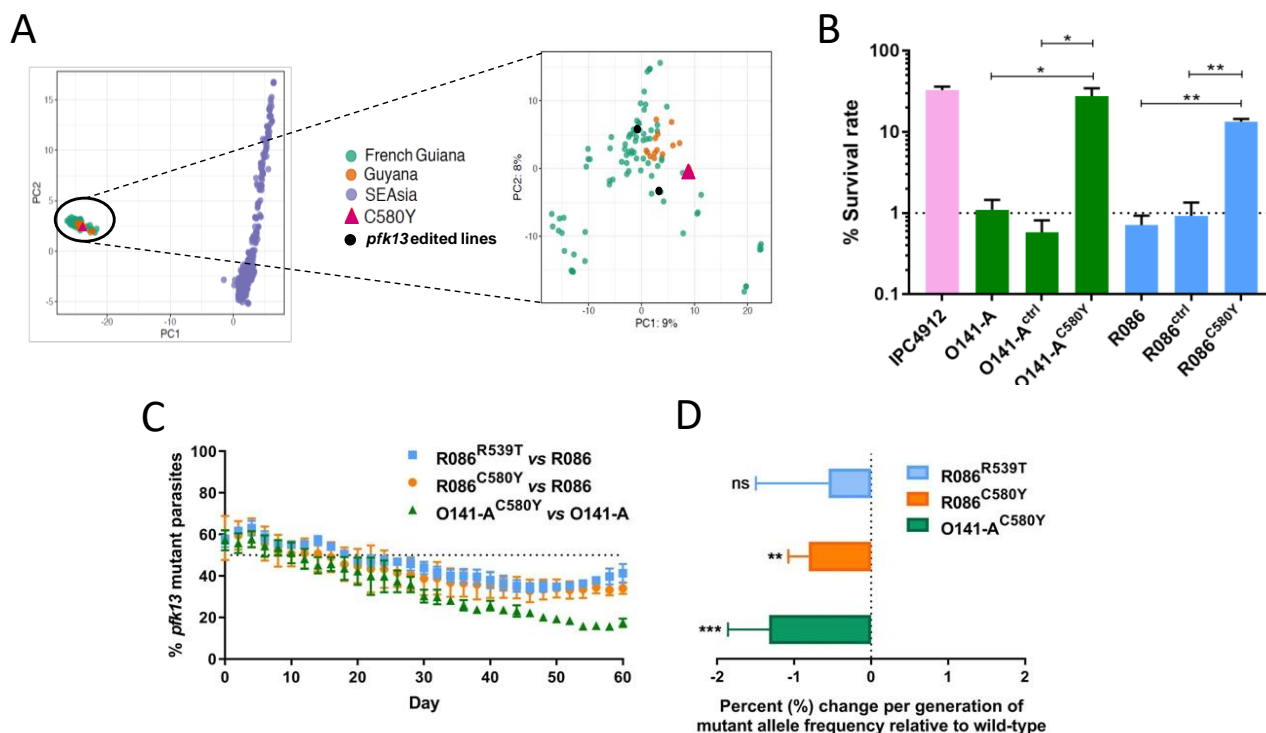


Figure 12. Caractérisation des mutants *pfk13* C580Y, Guyana, 2016-2017.

A. Analyse en composante principale des parasites du Guyana comparés à ceux de Guyane et d'Asie du Sud-Est basée sur les mutations ponctuelles observées au travers du génome parasitaire. Les parasites de Guyane et du Guyana (deux pays géographiquement proches) forment un groupe homogène différent de ceux d'Asie. **B.** Taux survie des souches isogéniques O141-A et R086. IPC4912 est une souche cambodgienne témoin de résistance mutée *pfk13* I543T. Les taux de survie ont été déterminés entre 0 et 3 heures post-invasion après une exposition de 6 heures à 700nM de dihydroartémisinine et mesuré par microscopie 66 heures après. L'écart-type a été déterminé sur la base d'au moins 3 réplicats. Les lignées parentales possèdent un gène *pfk13* sauvage, les contrôles (ctrl) cinq mutations silencieuses au niveau de *pfk13* introduites par la méthode des nucléases en doigt de zinc. Enfin, les lignées C580Y et R539T possèdent ces mutations ainsi que les cinq mutations silencieuses. Une souche est considérée comme résistante si son taux de survie est supérieur à 1%. Le test t de Student a été utilisé pour déterminer le degré de significativité des différences avec les taux de survie parentaux : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **C.** Fréquence allélique des mutants au cours des tests de compétition de croissance déterminée par PCR en temps réel sur une période de 60 jours tous les deux jours. Les valeurs représentent les pourcentages de mutants *pfk13*. L'écart-type a été déterminé sur la base de deux réplicats biologiques et deux réplicats techniques. Un pourcentage inférieur à 50% indique que les mutants sont moins aptes à la multiplication que les sauvages. **D.** Pourcentage de changement par génération du mutant par rapport au sauvage. Cette différence a été calculée en fonction de la moyenne des fréquences alléliques sur 60 jours. Les écart-types ont été calculés sur la base de deux réplicats biologique pour chaque co-culture. Le degré de significativité a été calculé en utilisant le test de Wilcoxon ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns: non significatif.

Deux études d'évaluation de l'efficacité thérapeutique de l'artéméther-luméfántrine ont été conduites au Guyana en espérant mesurer l'impact de ces mutants sur l'efficacité thérapeutique de l'association. En 2014, une première étude avait déjà été réalisée mais n'avait pas permis de mettre en évidence de mutants, de retard de clairance ou d'échec thérapeutique (P30). La deuxième étude en 2018-2019 incluait les patients à Georgetown, la capitale, et Port Kaituma, une des principales villes de la Région 1. Sur 173 patients inclus (99 à Georgetown et 74 à Port Kaituma), aucun n'était porteur de parasites mutants *pfk13* C580Y. Cinq échecs thérapeutiques ont été observés, un lié à une réinfection et quatre autres à une résistance probable de la molécule partenaire si on considère que le traitement a été correctement pris et absorbé. Aucun dosage pharmacologique n'a pu être réalisé pour valider les concentrations médicamenteuses plasmatiques. J'ai participé à cette étude pour caractériser génétiquement ces recrudescences et les parasites associés mais également comme conseiller technique de l'OMS sur place pour auditer et superviser l'étude en cours de réalisation.

P30 Rahman R, Martin MJ, Persaud S, Ceron N, Kellman D, **Musset L**, Carter KH, Ringwald P. Continued Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to Artemisinin in Guyana, With Absence of Kelch Propeller Domain Mutant Alleles. **2016**. *Open Forum Infect Dis*. 30: epub. IF n+3: 3.37. DOI: [10.1093/ofid/ofw185](https://doi.org/10.1093/ofid/ofw185).

Epicentre de la résistance et risques de dispersion associés

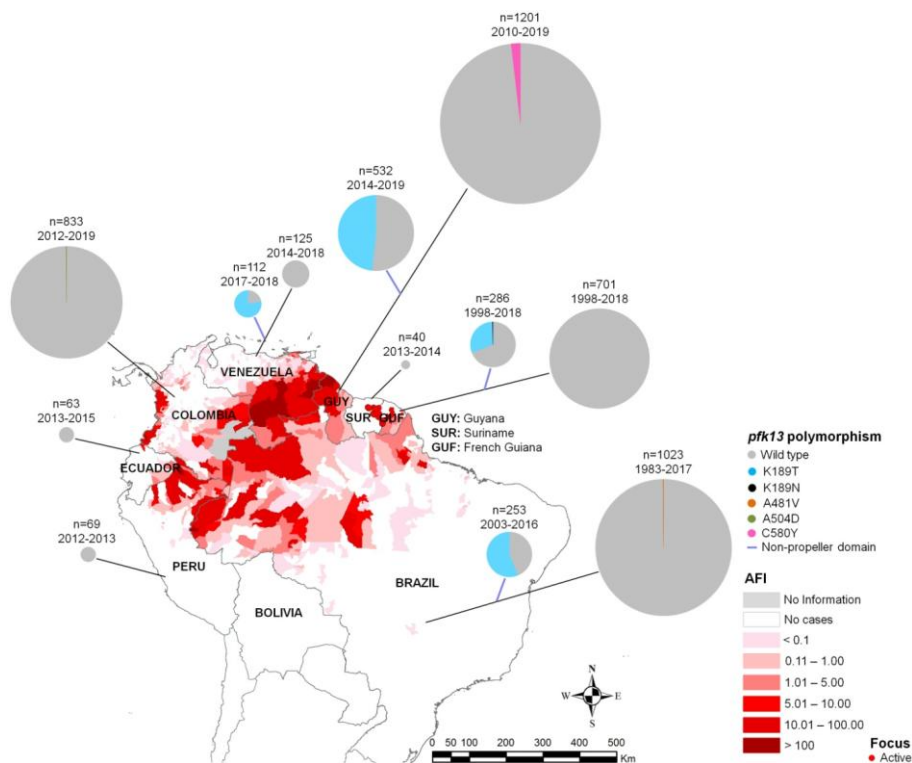
Porteur du projet : L. Musset

Collaborations : H. Cox - Ministère de la santé publique du Guyana
M. Magris, Vénézuéla

M. Lacerda, W. Monteiro Fondation de Médecine Tropicale Hector Dourado, Manaus, Brésil

Financements : PAHO-WHO, Guyamazon III, FEDER ELIMALAR

Alors que les signaux en provenance du Guyana montraient un début de sélection de la résistance dans les régions où les antipaludiques sont utilisés de manière erratique, nous avons choisi d'analyser l'ensemble des isolats de *P. falciparum* dont nous disposons en provenance de la région est amazonienne. Ainsi, plus de 1000 isolats en provenance de Guyane, de Manaus au Brésil et du Vénézuéla ont été génotypés au niveau du gène *pfk13* (Figure 13). Une mutation A481V a été identifiée dans la région propeller de *pfk13* chez un isolat de Manaus. Cette mutation n'entraîne visiblement pas de retard de clairance majeur chez les patients (WWARN 2019). L'étude du polymorphisme naturel de la région non active du gène (partie 5') a permis d'identifier un polymorphisme naturel présent au niveau de la position 189 avec une lysine substituée en thréonine (K189T) ainsi qu'une mutation R255K. Tous les isolats de la région de Manaus présentent la mutation K189T, 78% au Vénézuéla, 47% au Guyana et seulement 32% en Guyane. Cette mutation est également décrite dans des isolats africains notamment au Sénégal. Au-delà de ces nouveaux isolats, une analyse des données de la littérature a été effectuée de manière à avoir une vision exhaustive des génotypes disponibles. Bon nombre de ces résultats ont été obtenus au sein de notre laboratoire.



Par ailleurs, une analyse du risque de dispersion des mutants à partir de la Région 1 du Guyana a été effectuée sur la base des mouvements de populations humaines estimés à l'aide du nombre de cas importés entre les différentes régions d'Amazonie. Ainsi, le risque de dispersion à partir du foyer actuellement identifié

du Guyana se situerait essentiellement à l'intérieur du Guyana lui-même dans un premier temps (Figure 14A). Dans un second temps, cette mutation se disperserait aux états du Roraima au Brésil et de Bolivar au Venezuela voisins (Figure 14B). Un lien très étroit existe également entre les états du Maranhão, Pará et Amapá au Brésil et les pays du plateau des Guyanes car les orpailleurs brésiliens qui y travaillent sont très souvent originaires de ces états. Ainsi, la mutation pourrait également se disperser dans ces zones, Amapá et Pará essentiellement, puisque le Maranhão n'est pas une zone de transmission du paludisme.

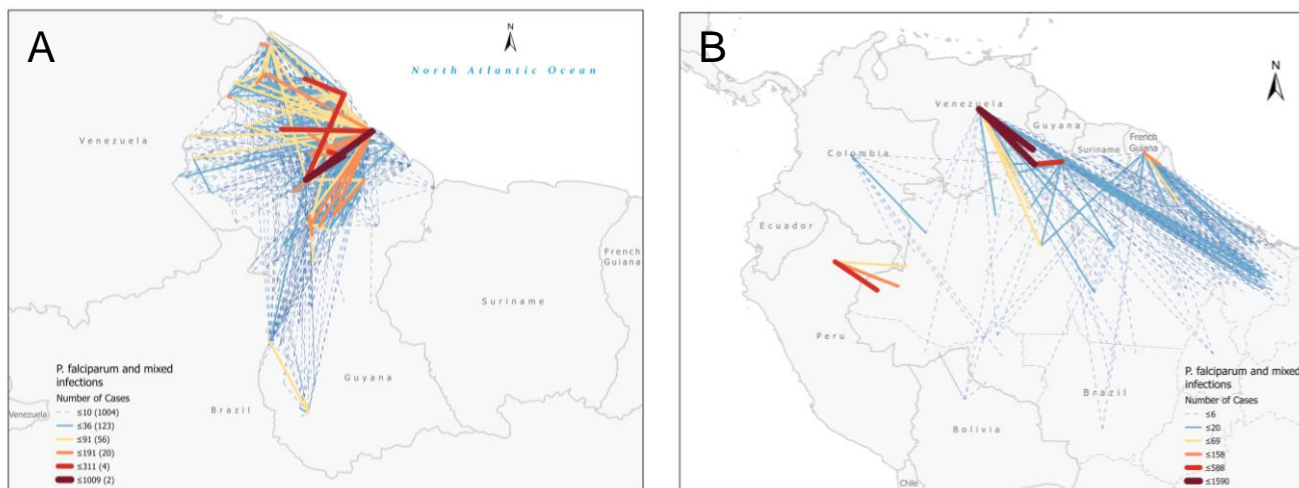


Figure 14. Mouvement des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*, entre le lieu potentiel de contamination et le lieu de diagnostic au Guyana (A) et en Amazonie (B), 2015-2018.
Sources Paho, Ministère de la santé publique du Guyana.

🔥 Ce travail sur l'épidémiologie et la compréhension de la résistance aux artémisinines en Amazonie a permis de démontrer : i) que la mutation C580Y dans le gène *pfk13* a d'ores et déjà été sélectionnée au Guyana indépendamment des sélections asiatiques, ii) qu'elle est effectivement responsable d'un phénotype de résistance chez les parasites amazoniens, iii) qu'elle se transmet actuellement sous la forme d'un clone. Enfin, sa présence semble aujourd'hui limitée à ce pays dans la région est amazonienne. Cependant l'échantillonnage analysé est très faible comparé aux nombres de cas recensés au Guyana et surtout au Venezuela. Ainsi, on ne peut pas exclure une circulation ou même une origine autre qui n'a pas pu être identifiée faute d'analyse suffisante. Cette mutation circule donc plutôt à bas bruit et en six ans, ne s'est pas dispersée. L'impact de cette mutation sur la biologie et les capacités de multiplication des parasites pourrait expliquer ce constat. Par ailleurs, la luméfántrine semble conserver une efficacité importante. Bien qu'elle ne soit pas l'unique association utilisée sur le plateau des Guyanes, l'artéméther-luméfántrine reste la recommandation officielle. L'utilisation de cette association efficace permet probablement de limiter la propagation des mutants qui n'ont qu'un avantage sélectif limité et peuvent se transmettre dans des zones où cette association est peu utilisée au profit de monothérapies ou de la dihydroartémisinine/pipéraquline qui semble avoir perdu une grande part de son efficacité (cf p.47). Ainsi, l'histoire de l'émergence de la résistance aux antipaludiques se répète et à nouveau nous constatons deux sites d'émergence initiaux : l'Asie du Sud-Est et l'Amazonie. Ces deux sites semblent propices à l'émergence du fait de la faible prévalence de *P. falciparum* dans ces zones. Ainsi, les compétitions entre clones sont plus limitées, l'immunité des patients aussi. Etant moins immun, ils sont généralement plus symptomatiques et la pression médicamenteuse qui en découle plus importante. Historiquement sur le plateau des Guyanes, dès qu'un trait avantageux est sélectionné chez les parasites, ce dernier se propage rapidement à l'ensemble des parasites et se fixe au sein de la population. Dans le cas de la résistance aux artémisinines, cette expansion est probablement limitée par l'efficacité de la molécule partenaire.

🗨️ **2017-2020.** L'ensemble des travaux sur ce thème ont été réalisés par une étudiante en Doctorat de sciences que je co-encadre avec le Pr Magalie Pierre-Demar du laboratoire hospitalo-universitaire de parasitologie-mycologie de l'Hôpital de Cayenne.

Les perspectives autour de cet axe sont nombreuses. Concernant les artémisinines, nous chercherons à mieux comprendre l'émergence/sélection de la résistance en mettant en œuvre des pressions médicamenteuses par la dihydroartémisinine. La vitesse de sélection de la résistance et d'apparition des mutations *pfk13* chez les isolats de Guyane sera comparée à celle d'un isolat collecté au Cambodge. Ces travaux seront réalisés en collaboration avec l'équipe de la faculté de pharmacie de Toulouse qui applique les mêmes méthodes sur des isolats en provenance d'Afrique. Ceci devrait nous permettre à terme de comparer les dynamiques et les marqueurs génétiques impliqués en fonction de la provenance des parasites. Ces pressions seront séquentielles, avec toujours la même concentration d'antipaludique, de façon à mimer au maximum la pression exercée sur les parasites au cours des traitements médicamenteux. Les paramètres étudiés seront le délai avant retour à une parasitémie de 1% ou encore le taux de survie mesuré par RSA toutes les cinq pressions. Par ailleurs, lorsque les ressources le permettront, j'envisage d'évaluer la capacité de transmission *via* le moustique de souches isogéniques mutées, C580Y ou R539T en collaboration avec l'unité d'entomologie médicale de l'Institut qui maîtrise la production de génération F1 d'*Anophèles darlingi*.

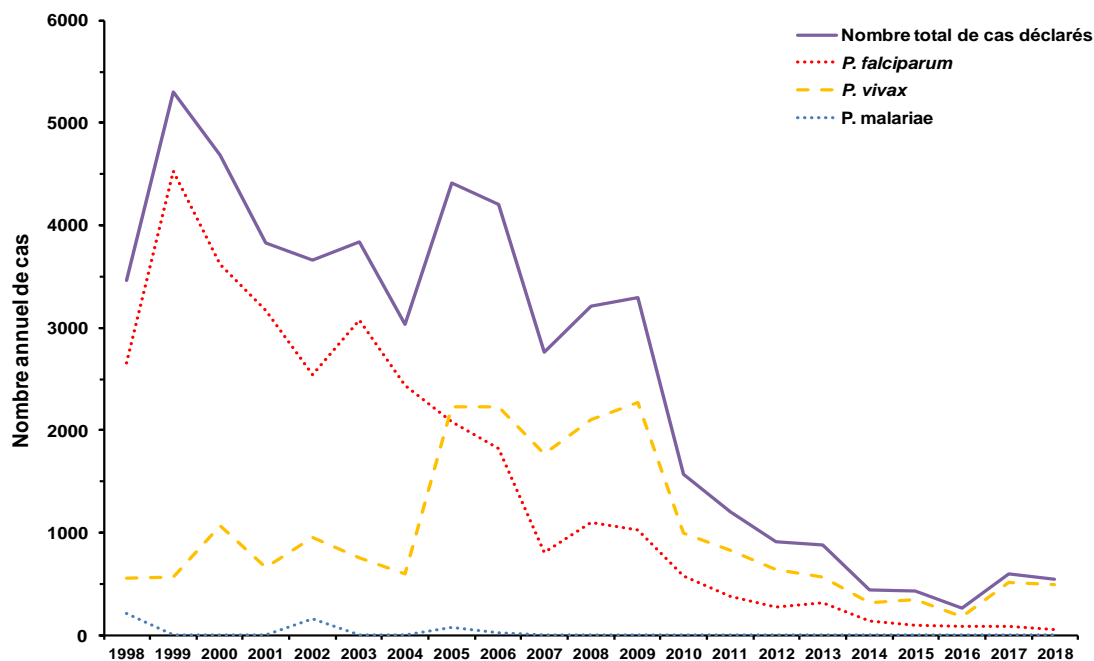
Concernant les molécules partenaires, nous envisageons également dans les mois qui viennent de nous intéresser à la résistance à la luméfantrine en analysant finement les nombreuses données *in vitro* actuellement disponibles et en tentant d'identifier un marqueur moléculaire de résistance. A ce sujet, une postdoctorante devrait être recrutée à la fin de l'année 2020 pour initier ce travail.

De manière plus prospective, nous avons engagé un projet il y a plusieurs années, Amazomics, qui visait à caractériser l'évolution adaptative des parasites au fil des ans, en fonction des pressions qu'ils subissent et de l'épidémiologie du paludisme en Guyane. Ce projet a été financé par le Labex Ceba à travers le projet Amazomics. Il est conduit en collaboration avec l'Université d'Harvard. Plus de 200 génomes sont ainsi en cours d'analyse de façon à identifier les régions du génome sous sélection ou inversement, désélectionnées. L'objectif sera aussi de décrire la structure génétique de la population parasitaire, en Guyane mais également au Guyana et de les comparer. L'échantillonnage au Guyana a été effectué dans un espace temps beaucoup plus court, une année *versus* 20 ans en Guyane. Nous espérons valoriser les premiers résultats fin 2020, début 2021, et ensuite se servir de cette base de données de génomes pour explorer de manière préliminaire de nouvelles questions de recherche (recherche de nouveaux marqueurs sur la base de phénotypes notamment).

ETUDE DE *PLASMODIUM VIVAX* EN GUYANE

🔥 En arrivant en Guyane pour poursuivre mes travaux de recherche sur le paludisme, je ne pouvais m'affranchir du contexte épidémiologique dans lequel j'évoluais. En vingt ans, le nombre de cas de paludisme a diminué d'un facteur 10 en Guyane (Figure 15) alors que dans le même temps, sa population humaine doublait. Le plateau des Guyanes est propice au développement du paludisme à *P. falciparum* notamment du fait de ses activités minières. Ainsi, en Amérique du Sud, c'est l'endroit où sa prévalence est la plus élevée. Cette espèce se transmet essentiellement en milieu isolé où l'accès au diagnostic et aux soins est limité. Ceci favorise l'utilisation anarchique des antipaludiques et la sélection de parasites résistants, d'où cet important volet de recherche (cf ci-dessus) que je dédie à la résistance aux antipaludiques, cœur de ma formation universitaire.

En 2005, une inversion des prévalences s'est produite et *P. vivax* est devenue l'espèce majoritairement présente en Guyane. Le traitement de ces accès palustres est le même depuis près de 50 ans, la chloroquine. Cette dernière est normalement associée à la primaquine pour éliminer les hypnozoïtes présents dans le foie. Les difficultés de prescription de cette molécule en Guyane limitent son utilisation et expliquent probablement en grande partie l'épidémiologie actuelle du paludisme avec une plus grande difficulté à limiter les reviviscences et donc le nombre de cas à *P. vivax*.



Source Cire Guyane.

Figure 15. Nombre de cas de paludisme recensés en Guyane entre 1998 et 2018.

La pression médicamenteuse exercée par la chloroquine depuis des dizaines d'années laisse craindre un début de sélection de parasites résistants tel que l'on peut le constater dans la région de Manaus au Brésil (de Santana Filho, Arcanjo et al. 2007, Marques, Costa et al. 2014). C'est dans ce contexte que j'ai conduit ou participé à plusieurs projets de recherche s'intéressant à *P. vivax* en Guyane et aux résistances médicamenteuses associées. Le premier volet visait à évaluer la pertinence d'une alternative thérapeutique telle que la sulfadoxine-pyriméthamine, le deuxième à évaluer l'efficacité thérapeutique de la chloroquine et le troisième, plus fondamental, à étudier la diversité génétique de cette population parasitaire.

Evaluation de la prévalence des mutations des gènes *pvdhfr* et *pvdhps* en Guyane

Porteur du projet : D. Ménard – Institut Pasteur de Madagascar
Financement : Observatoire de la Résistance aux Antipaludiques (ORA)

L'objectif de ce travail était d'évaluer, sur la base des marqueurs de résistance connus chez *P. falciparum*, le niveau de résistance de *P. vivax* à la sulfadoxine-pyriméthamine.

Pour ce faire, un génotypage des gènes orthologues de *falciparum* impliqués dans la résistance à cette association, *pvdhfr* codant pour la dihydrofolate réductase et *pvdhps* codant pour la dihydroptéroate synthase, a été réalisé chez 90 isolats de *P. vivax* collectés entre 2000 et 2005 en Guyane.

Tous les échantillons analysés présentaient des mutations sur les deux gènes avec une prévalence de plus de 90% pour les mutations S58R et S117N sur le gène *pvdhfr* et S382C et A383G sur le gène *pvdhps*. Une nouvelle mutation, S116G, a été retrouvée à une fréquence de 3,3%. Au total, six génotypes différents ont été observés avec une prédominance (59,3%) du quintuple mutant 58R/117N/173L-382C/383G. Aucune variation de prévalence entre les années n'a été retrouvée.

🔥 Ces résultats suggèrent qu'en Guyane, l'utilisation de cette association en thérapeutique en cas de résistance massive à la chloroquine n'est pas envisageable.

📖 **P4.** Barnadas C, Musset L, Legrand E, Tichit M, Briolant S, Fusai T, Rogier C, Bouchier C, Picot S, Ménard D. High prevalence and fixation of *Plasmodium vivax dhfr/dhps* mutations related to sulfadoxine/pyrimethamine resistance in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg*, **2009**. 81: 19-22. IF n+2: 2.59. DOI: [10.4269/ajtmh.2009.81.19](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.19).

Génotype *pvmdr1* et résistance de *Plasmodium vivax* à la chloroquine en Guyane

Porteur du projet : E. Legrand
Financement : Santé Publique France

Cette étude avait pour objectif de déterminer la variabilité génétique et le nombre de copies du gène *pvmdr1*, impliqué dans la résistance à la chloroquine chez *P. falciparum* et pour lequel on supposait une implication chez *P. vivax*. Ainsi, 480 isolats collectés en Guyane entre 1997 et 2013 ont été analysés.

Les résultats ont identifié quatre allèles circulants en Guyane. L'un d'entre eux incluait les mutations Y976F et F1076L potentiellement impliquées dans la résistance de *P. vivax* à la chloroquine en Asie notamment. Ce dernier était présent chez 1% (5/420) des isolats analysés. L'analyse temporelle n'a pas montré de différence significative de la proportion des différents allèles dans le temps ($p > 0,05$).

Le nombre de copies du gène *pvmdr1* a été déterminé pour 471 isolats. Le nombre de copies variait de 1 à 8. 68,6% des isolats présentaient une copie unique du gène et 31,4 % des isolats au moins deux copies. L'analyse temporelle avait cette fois montrée une diminution des isolats multicopies au cours du temps avec un pourcentage passant de 71,3% pour la période 1997-2004 à 12,6% pour la période 2009-2013.

Les résultats de cette étude ont montré qu'un pourcent des isolats circulants en Guyane étaient potentiellement résistants à la chloroquine sur la base de leur génotype, davantage sur la base de l'amplification du gène *pvmdr1*. Cependant, nous ne disposons pas de données phénotypiques pour confirmer ce lien génotype/phénotype de résistance à la chloroquine.

📖 **P31.** Faway E, Musset L, Pelleau S, Volney B, Casteras J, Caro V, Menard D, Briolant S, Legrand E. *Plasmodium vivax* multidrug resistance-1 gene polymorphism in French Guiana. *Malar J*. **2016**. 15: 540. IF n+2: 2.85. DOI: [10.1186/s12936-016-1595-9](https://doi.org/10.1186/s12936-016-1595-9).

🗨️ **2013.** Ce travail a été réalisé avec l'implication d'une étudiante en master 2 que j'ai co-encadrée avec E. Legrand.

Efficacité thérapeutique de la chloroquine de *Plasmodium vivax* en Guyane entre 2009 et 2015

Porteurs du projet : L. Musset – F. Djossou Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales de l'Hôpital de Cayenne
Financement : Santé Publique France

En Amérique du Sud, la résistance à la chloroquine de *P. vivax* a été décrite à Manaus au Brésil, épice de la résistance dans la région amazonienne, à Oiapoque et en Bolivie. L'objectif de cette étude était d'amener de nouvelles données sur la résistance à *P. vivax* en Guyane en associant une évaluation rétrospective de l'efficacité thérapeutique et une analyse des parasitemies récurrentes de patients revenant en consultation avec de la fièvre.

Les dossiers des patients présentant une infection à *P. vivax* confirmée par microscopie et une température supérieure à 37,5°C à l'Hôpital de Cayenne ont ainsi été analysés entre mars 2009 et octobre 2015. Le suivi et la réponse thérapeutique ont été réalisés selon le protocole de l'OMS. La résistance parasitaire a été confirmée par un dosage plasmatique de la concentration en chloroquine présente chez le patient et la caractérisation des marqueurs microsatellites des parasites présent le jour de l'échec. Enfin, le gène *pvmr1* (séquence et nombre de copies du gène) a été analysé chez les isolats résistants.

Après 28 jours de suivi, 164 patients ont présenté une réponse clinique et parasitologique adéquate. Huit cas d'échec thérapeutique ont été identifiés (5%, n=8/172), tous après J14. L'efficacité thérapeutique de la chloroquine a été évaluée à 95% IC 91,7-98,3 (n=164/172). Au sein de ces huit échecs, cinq ont pu être caractérisés : deux cas de résistance (1,2% ; 95% CI 0-2,8 ; n=2/172) et trois cas avec une concentration sub-thérapeutique en chloroquine suggérant un défaut d'absorption ou d'observance. Aucune mutation n'a été identifiée dans le gène *pvmr1* des parasites résistants, pas plus qu'une amplification génique.

🔥 La résistance de *P. vivax* à la chloroquine en Guyane existe mais son niveau ne nécessite aucun changement des recommandations thérapeutiques. Cependant, il est important de prescrire davantage de primaquine pour limiter au maximum la transmission de *P. vivax* et ainsi la diffusion d'éventuels parasites résistants. Le génotype *pvmr1* n'étant pas informatif, l'identification d'un marqueur moléculaire de résistance de *P. vivax* à la chloroquine reste une priorité pour surveiller plus facilement cette résistance.

📖 **P40. Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Volney B, Walter G, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. Emergence of *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2019**. 63(11). IF 2018: 4.72. DOI: [10.1128/AAC.02116-18](https://doi.org/10.1128/AAC.02116-18).

🗨️ **2015-2016**. Ce travail a été réalisé avec l'implication d'un interne en DES de biologie médicale. J'ai également été pour ce travail sa directrice de thèse d'exercice de médecine.

Une étude du même type à laquelle j'ai collaboré a été conduite à Oiapoque, ville brésilienne située en face de St Georges de l'Oyapock, où 1% d'isolats résistants ont été identifiés sans lien avec des mutations au sein du gène *pvmr1*.

📖 **P22. Gomes MS**, Vieira JL, Machado RL, Nacher M, Stefani A, **Musset L**, Legrand E, Menezes RA, Júnior AA, Sousa AP, Couto VS, Couto AA. Efficacy in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. *Malar J*. **2015**. 14: 402. IF n+2: 2.85. DOI: [10.1186/s12936-015-0925-7](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0925-7).

Etude de la diversité génétique de *P. vivax* en Guyane

Porteurs du projet : L. Musset – B. de Thoisy, Laboratoire Interactions Virus/Hôte, IP Guyane, Cayenne, France.
Collaborations : S. Briolant, H. Bogreau, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France.
D. Neafsey, Broad Institute, Cambridge, USA
Financement : Santé Publique France

Comprendre la structure génétique d'une population parasitaire est essentielle pour comprendre la dynamique de la transmission, sa géographie mais également pour prédire la rapidité de propagation d'un phénotype d'intérêt (parasites résistants par exemple).

En analysant et comparant un panel de 15 marqueurs microsatellites (MS) et un panel de 42 mutations ponctuelles (SNP) de 223 isolats de *P. vivax* collectés entre 2006 et 2010 dans 18 localités de Guyane, la multiplicité des infections, la dynamique de la population et son évolution ont été étudiées. La variation

génétique a été comparée d'une région à l'autre, d'une année à l'autre et selon la saisonnalité de la transmission du paludisme.

Les marqueurs MS et SNP étaient suffisamment informatifs et polymorphes pour caractériser la génétique de la population. Les MS étaient généralement plus polymorphes que les SNP. L'analyse des résultats obtenus sur le même groupe d'échantillons a permis de confirmer que les MS évoluent plus vite que les SNP et qu'ils sont plus performants pour analyser les événements récents liés à l'évolution d'une population parasitaire.

Les MS ont permis d'identifier 60,3% d'infections polyclonales en Guyane au cours de cette période. Cet important niveau de polyclonalité avait déjà été décrit chez *P. vivax* dans la région (Orjuela-Sanchez, Brandi et al. 2013). Cette polyclonalité est plus importante que pour *P. falciparum* (Barry, Waltmann et al. 2015) notamment du fait d'importants brassages génétiques des parasites favorisés par les reviviscences. Ils ont également permis de mettre en évidence des expansions clonales ponctuelles à l'origine d'épidémies dans une région donnée telle que celle observée en 2006 à St Georges de l'Oyapock.

A une échelle de temps plus ancienne, l'analyse des marqueurs, MS ou SNP, montre une population homogène probablement issue d'une introduction unique. Cette homogénéité est là encore probablement liée aux importantes migrations humaines au sein du plateau des Guyanes qui participent à un brassage et une homogénéisation génétique de la population parasitaire (Figure 16).

Associés aux importants mouvements de la population humaine guyanaise, ces résultats laissent présager une diffusion rapide d'un génotype d'intérêt après sa sélection.

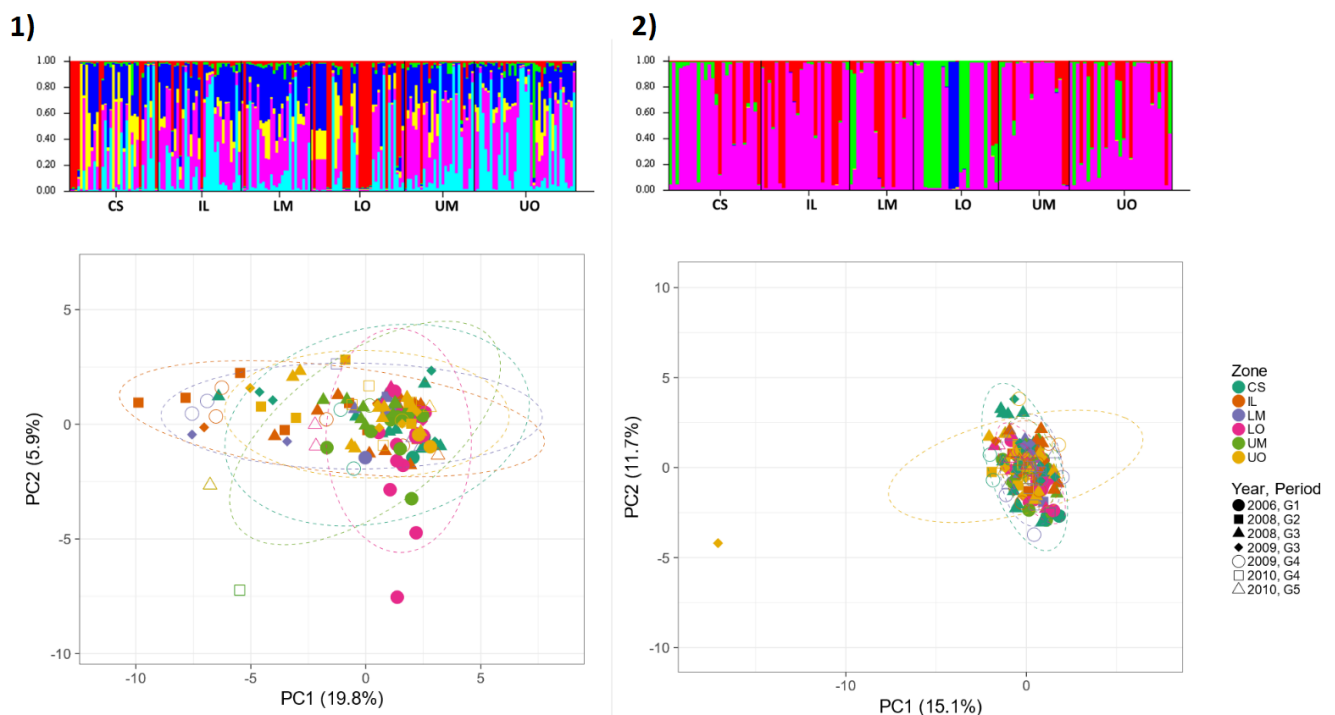



Figure 16. Analyses bayésienne et en composante principale de la diversité génétique de *P. vivax* en Guyane, 2006-2010.


1) analyse de 15 marqueurs microsatellites et 2), de 42 mutations ponctuelles de 142 isolats. CS : région côtière, IL : intérieur, LM : bas Maroni, LO : bas Oyapock, UM : haut Maroni, UO : haut Oyapock, G1 à G5 : périodes épidémiologique allant de avril à mars l'année suivante.

P ? Salmier S, Bogreau B, Baniecki ML, Ha Nguyen KY, Briolant S, Legrand E, de Thoisy B, Neafsey D, Musset L. Inputs from microsatellite and SNP markers to characterize a highly polymorphic but undifferentiated *Plasmodium vivax* population in French Guiana. En préparation.

Avant la publication du jeu de données dans son ensemble, une partie des résultats de barcoding a été publiée en collaboration avec nos partenaires d'Harvard :

 **P18.** Galinsky K, Valim C, Salmier A, de Thoisy B, **Musset L**, Legrand E, Faust A, Baniecki ML, Ndiaye D, Daniels RF, Hartl DL, Sabeti PC, Wirth DF, Volkman SK, Neafsey DE. COIL: a methodology for evaluating malarial complexity of infection using likelihood from single nucleotide polymorphism data. *Malar J*, **2015**. 14: 4. *IF n+2*: 2.85. DOI: [10.1186/1475-2875-14-4](https://doi.org/10.1186/1475-2875-14-4).

 **P17.** Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky K, Daniels RF, Hamilton E, Ferreira MU, Karunaweera ND, Serre D, Zimmerman PA, Sa JM, Wellems TE, **Musset L**, Legrand E, Melnikov A, Neafsey DE, Volkman SK, Wirth DF, Sabeti PC. Development of a single nucleotide polymorphism barcode to genotype *Plasmodium vivax* infections. *PLoS Negl Trop Dis*, **2015**. 9:e0003539. *IF n+2*: 4.37. DOI: [10.1371/journal.pntd.0003539](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003539).

 **2010-2020.** Ce travail a été réalisé avec l'implication d'une étudiante en master 2 qui est ensuite revenue au cours d'un post-doctorat pour finaliser l'analyse de ces résultats.

UNE RECHERCHE OPERATIONNELLE AU SERVICE DU CONTROLE DU PALUDISME

🔥 Pour lutter efficacement contre le paludisme, il est nécessaire d'avoir des traitements efficaces mais également des outils de diagnostic performants. Au-delà de cela, il faut savoir où se trouve les poches de transmission, qui elles concernent, et pourquoi. Enfin, pour atteindre l'élimination de la pathologie dans une zone, les personnes qui y habitent et y sont exposées doivent être informées du risque qu'ils encourent et des attitudes à adopter pour mieux se protéger.

C'est autour de ces aspects, diagnostic, caractérisation des zones de transmission et éducation de la population, que j'ai développé, depuis 2010, un certain nombre de projets de recherche opérationnelle.

Performances des méthodes de diagnostic utilisées dans le cadre de la prise en charge du paludisme

🔥 Depuis 2009, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande de confirmer rapidement toute suspicion de cas de paludisme avant de délivrer un traitement antipaludique adapté en procédant à un diagnostic de certitude basé sur la recherche des plasmodies par microscopie ou test de diagnostic rapide (TDR) avant d'administrer un traitement antipaludique adapté. Cette recommandation a conduit à un essor des TDR qui sont devenus des outils de diagnostic de choix dans les zones reculées aux infrastructures limitées. Leur déploiement a ainsi permis d'accélérer et de faciliter la prise en charge des patients atteints de paludisme. Par voie de conséquence, les traitements présomptifs ont diminué et la pression médicamenteuse aussi.

Performances du test rapide Pf/Pan SD Bioline® et du test en place, OptiMAL-IT®, pour le diagnostic du paludisme en Guyane, 2010-2011.

Porteurs du projet : L. Musset

Collaborations : B. Carme, D. Blanchet, Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, F. Berger, Unité d'épidémiologie, Institut Pasteur de la Guyane.

Financement : Santé Publique France

🔥 Au moment où l'OMS déconseillait l'utilisation des tests recherchant la protéine PfHRP₂ en Amérique du Sud du fait de la forte prévalence de parasites délétés au niveau de ce gène, les CDPS de Guyane souhaitaient délaissier l'OptiMAL-IT®, test détectant la protéine pLDH, au profit d'un test PfHRP₂, le SD Malaria Ag P.f/Pan®. Leurs motivations étaient le coût mais surtout une meilleure sensibilité des tests PfHRP₂ pour détecter *P. falciparum*.

Ainsi, l'objectif de notre étude a été d'évaluer les performances de ces deux tests par rapport à la méthode de référence, l'examen microscopique, réalisé dans les conditions de routine, au centre de santé de Camopi et au laboratoire de parasitologie de l'Hôpital de Cayenne.

Entre janvier 2010 et août 2011, 1179 suspicions de paludisme ont été incluses dans l'étude. Pour le diagnostic de *P. falciparum*, le test le SD Malaria Ag P.f/Pan® présentait une meilleure sensibilité que l'OptiMAL-IT® (92,2% vs 83,7%, p=0,04) et meilleure spécificité (98,6% vs 92,4%, p<0,001), de même pour la sensibilité liée au diagnostic de *P. vivax*, 82,6% vs 55,6% (p<0,001). Par contre, aucune différence significative n'était observée concernant la spécificité.

Les discordances étaient plus fréquemment observées entre la microscopie et les TDR au centre de santé de Camopi (p<0,001). Ces discordances ont été expliquées par l'analyse des prélèvements par PCR. Un grand nombre de faux positifs ont été diagnostiqués par microscopie du fait du manque de formation régulière des lecteurs.

Enfin, beaucoup d'échantillons délétés au niveau du gène *pfhrp2* ayant été rapportés en Amérique du Sud, nous avons analysé l'exon 2 de ce gène par séquençage pour 41 échantillons. Aucune délétion n'a pu être observée et l'allèle majoritaire de PfHRP₂ circulant en Guyane a pu être décrit.

Le TDR SD Malaria Ag P.f/Pan® était donc performant et adapté au diagnostic du paludisme en Guyane. Il a ainsi été déployé et l'est toujours actuellement dans les Centres Délocalisés de Prévention et de Soins.

P12. Trouvay M, Palazon G, Berger F, Volney B, Blanchet D, Faway E, Donato D, Legrand E, Carme B, **Musset L.** High performances of histidine-rich protein 2 based rapid diagnostic tests in French Guiana are explained by the absence of *pfhrp2* gene deletion in *P. falciparum*. *PLOS One*, 2013. 8: epub. IF n+2: 4.41. DOI: [10.1371/journal.pone.0074269](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074269).

2011. Ce travail a été réalisé avec l'implication d'une étudiante en master 2 de santé publique que j'ai encadrée et d'un interne en biologie médicale encadré au laboratoire de parasitologie-mycologie de l'Hôpital de Cayenne.

Prévalence des délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes

Porteur du projet : L. Musset
Collaborations : H. Cox - Ministère de la santé publique du Guyana
M. Magris, Vénézuéla
Financement : PAHO, Santé publique France

Les tests rapides détectent trois types de protéines : la lactate déshydrogénase (LDH), l'aldolase ou encore la protéine 2 riche en histidine (Pf-HRP2). Des parasites délétés pour le gène *pfhrp2*, qui code cette protéine, ont été décrits en Amazonie (Gamboa, Ho et al. 2010). Dans de telles situations, le risque est d'étiqueter à tort un accès à *P. falciparum* comme un accès à *P. vivax* et de le traiter par chloroquine alors que sur le plateau des Guyanes, 20 à 30% des parasites sont chloroquino-résistants. En raison des flux migratoires et de la place des TDR dans cette région, une surveillance accrue de ces délétions était donc nécessaire. Par ailleurs, les dernières données disponibles pour la Guyane et le Guyana dataient de 2010, aucune donnée pour le Vénézuéla.

Ainsi, des isolats collectés entre 2015 et 2018 en Guyane, au Guyana et au Vénézuéla ont été étudiés selon les recommandations de l'OMS afin d'estimer la prévalence des délétions au niveau des gènes *pfhrp2/3*. Huit PCR analysant les deux parties, jonction exon 1-2 et exon 2, des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* et leurs gènes adjacents ont ainsi été utilisées. Le protocole d'étude comprenait également une PCR en temps réel comme méthode semi-quantitative permettant d'évaluer la quantité et la qualité de l'ADN des isolats étudiés afin de sélectionner les échantillons analysables et de limiter la surestimation des parasites délétés par simple fait que l'ADN était altéré ou en trop faible quantité. Un algorithme d'étude a également été mis en place intégrant la nécessité de limiter la consommation d'ADN. En effet, cette quantité est toujours limitée et la caractérisation des délétions requiert de nombreuses analyses consommatrices d'ADN. Aussi, seules des PCR nichées ont été utilisées pour augmenter la sensibilité sachant que les analyses se font généralement sur de l'ADN extrait de petites quantités de sang capillaire collecté sur papier buvard.

Au total, 633 isolats ont été étudiés. Au Vénézuéla (n=105), 1,9% IC₉₅ [0,0 – 4,6] des parasites présentaient une délétion au niveau de *pfhrp2* et 46,6% IC₉₅ [37,0 – 56,2] au niveau du gène *pfhrp3* (Figure 17). Au Guyana (n=298) et en Guyane (n=230), aucun parasite délété pour le gène *pfhrp2* n'a été mis en évidence et respectivement 2,5% IC₉₅ [0,7 – 4,3] et 0,5% IC₉₅ [0,0 – 1,5] pour le gène *pfhrp3*.

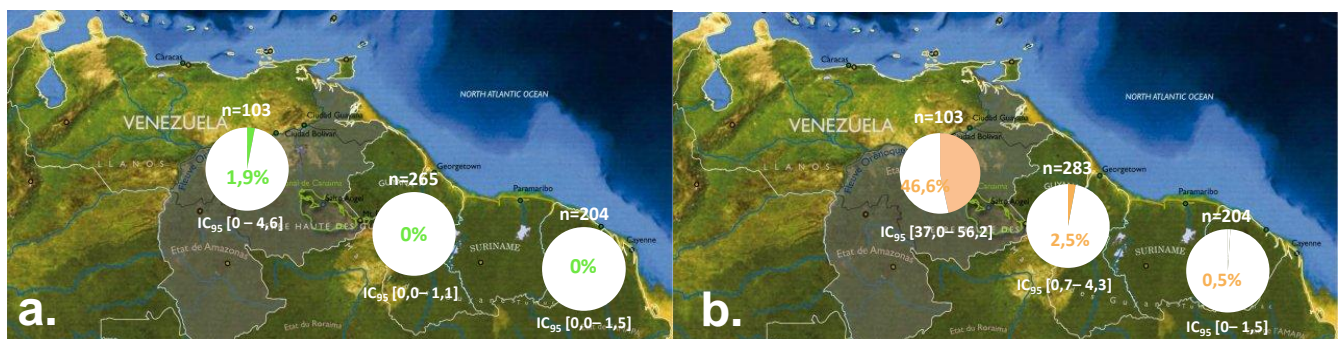


Figure 17. Prévalence des délétions du gène *pfhrp2* et *pfhrp3* sur le plateau des Guyanes, 2014-2018.
a) *pfhrp2*, b) *pfhrp3*.

Les délétions *pfhrp2* sont généralement totales et incluent une délétion du gène en aval MAL7P1.230. Les délétions *pfhrp3* sont aussi totales et plus larges en incluant aussi les deux gènes adjacents, l'amont (MAL13P1.475) et l'aval (MAL13P1.485).

🔥 Ces données mettent pour la première fois en évidence des isolats délétés pour le gène *pfhrp2* au Venezuela et confirme leur absence en Guyane et au Guyana. La surveillance reste donc de mise dans ce pays mais les TDR basés sur Pf-HRP2 restent une bonne alternative diagnostique.

🔍 Les résultats au Venezuela restent cependant à confirmer sur un échantillonnage plus important incluant au minimum 350 isolats si on se base sur une prévalence moyenne de délétion de 3%. Cette confirmation devrait avoir lieu courant 2021 en même temps que la valorisation de ces résultats.

🗨️ **2016-2017.** Ce travail a été réalisé avec l'implication d'une interne en DES de biologie médicale. J'ai également été sa directrice de thèse d'exercice de médecine.

Intérêt du TDR SD Bioline® Pf/Pv pour détecter les infections mixtes en Guyane

Porteur du projet : L. Musset

Financement : ARS Guyane

🔥 Dans les centres délocalisés de prévention et de soins (CDPS) de Guyane, le diagnostic du paludisme repose sur les tests rapides. Le TDR SD Bioline® Pf/Pan utilisé permet de différencier *P. falciparum* mais pas *P. vivax*. Ainsi, les infections mixtes ne sont pas identifiées. Cet élément limite la prise en charge des patients car on ne leur prescrit pas de primaquine. Or, compte tenu de la prévalence de *P. falciparum* et *P. vivax*, les infections mixtes ont pu représenter jusqu'à 20% des infections dans certaines régions situées le long de l'Oyapock.

En 2018, le laboratoire a évalué l'intérêt d'utiliser un test de diagnostic rapide permettant de distinguer les infections mixtes *P. falciparum*/*P. vivax* des infections à *P. falciparum*. Le TDR SD Bioline® Pf/Pan actuellement utilisé a été comparé au TDR SD Bioline® Pf/Pv au regard de la microscopie corrigée par PCR en temps réel.

Sur les 91 infections mixtes détectées par microscopie, 70 ont été confirmées par PCR. Les autres étaient des mono-infections. En premier lieu, ces résultats montrent que les infections mixtes ont tendance à être surestimées par microscopie, notamment la présence de *P. falciparum*. La crainte du microscopiste de passer à côté de cette espèce potentiellement mortelle pourrait expliquer cela. Sur les 70 isolats mixtes, le TDR SD Bioline® Pf/Pv a permis de détecter une infection mixte dans 62,8% des cas. Les cas non détectés l'étaient essentiellement du fait de la faible parasitémie de l'espèce minoritaire.

Déployer ce type de test voudrait dire renoncer à l'identification des cas à *P. malariae* puisqu'il n'inclut pas de bande Pan spécifique de l'ensemble des espèces plasmodiales pouvant infecter l'Homme. *P. malariae* est aujourd'hui extrêmement rare en Guyane. Nous avons tout de même testé la capacité des tests SD Bioline® Pf/Pan actuellement utilisés à détecter cette espèce à partir de neuf isolats disponibles dans la collection du CNR. Il n'en a détecté aucun alors que les parasitémies étaient comprises entre 0,01 et 0,5%. En changeant de test, nous ne perdons donc rien par rapport à la situation actuelle mais ceci prouve qu'actuellement, les cas à *P. malariae* sont mal diagnostiqués par les TDR au sein des CDPS. En cas de patient présentant des signes évocateurs et un TDR négatif, les médecins des CDPS ont la possibilité de remédier cette limitation par l'envoi d'un prélèvement pour examen microscopique et/ou PCR à Cayenne notamment. Les résultats sont alors rendus dans les 24h pour la microscopie et cinq jours pour la PCR.

Le changement de test au profit du SD Bioline® Pf/Pv devait être discuté en comité de suivi du plan paludisme. L'actualité et la surcharge de travail des différents services ont entraîné le report de cette discussion.

Perspectives en terme d'étude et développement d'outils diagnostic

Evaluation d'une méthode de dosage rapide de l'enzyme G6PD et génotype associé

Porteur du projet : L. Musset

Financement : ARS Guyane

🔥 En Guyane, le paludisme est endémique et deux espèces prédominent : *P. falciparum* et *P. vivax*. Le traitement contre le paludisme à *Plasmodium vivax* inclut : la nivaquine pendant 3 jours pour éliminer les parasites sanguins circulants, et la primaquine pendant 14 jours contre les parasites dormants dans le foie, les hypnozoïtes. La primaquine peut générer des anémies hémolytiques iatrogènes chez les patients souffrant de favisme, à savoir d'un déficit en enzyme Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase (G6PD). Cette hémolyse

peut être suffisamment sévère pour entraîner le décès du patient déficitaire. Ainsi, les recommandations de l'OMS et du HCSP indiquent qu'il faut réaliser un dosage quantitatif de l'activité de cette enzyme avant sa prescription.

Ce déficit est une maladie héréditaire récessive liée au chromosome X caractérisée par des taux plus ou moins bas d'activité enzymatique qui est fonction du génotype des patients mais pas uniquement car le phénotype dépend du niveau d'activation du chromosome X pour chaque cellule. A l'heure actuelle, l'obtention d'un dosage en G6PD en Guyane est long puisqu'il est fait en France continentale et que les conditions pré-analytiques sont assez exigeantes. Ce délai inclut : le dosage de la G6PD à distance de l'accès, l'obtention du résultat du dosage G6PD puis de l'ATU nominative qui libère la primaquine pour un patient donné. Ainsi, dans les zones de transmission de *P. vivax*, les patients font généralement un accès de reviviscence (autour de J28) avant de se voir prescrire la primaquine.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances d'un test quantitatif rapide de dosage de l'activité en G6PD par gramme d'hémoglobine, « STANDARD G6PD » (SD BIOSENSOR) pour la détection des patients déficients en comparaison avec la méthode enzymatique de référence. Les objectifs secondaires de cette étude seront la vérification de la méthode d'analyse selon les recommandations de la norme NF EN ISO 15189:2012 et l'évaluation du lien génotype/phénotype en fonction des variants du gène G6PD retrouvés.

Les sujets présentant un déficit sévère sont rares en Guyane (<0,3%). Si l'inclusion se faisait de manière prospective, sans identification préalable des sujets déficients, le nombre de sujets nécessaire à l'inclusion serait d'environ 6 000 personnes pour obtenir environ 50 sujets présentant un déficit sévère d'activité en G6PD.

Pour faciliter les inclusions, cette étude sera donc réalisée chez des personnes dont le statut en G6PD est connu. Les 150 sujets sont à inclure dans l'étude et se répartissent de la manière suivante :

- ✓ 50 sujets avec une activité déficiente de G6PD (< 3,6 U/g Hb, catégorie « déficientes sévères »)
- ✓ 50 sujets avec une activité intermédiaire de G6PD (< 9,6 U/g Hb, catégorie « intermédiaires »)
- ✓ 50 sujets avec une activité normale de G6PD (\geq 9,6 U/g Hb, catégorie « normaux »)

Le protocole de recherche a été approuvé par le comité d'éthique du nord-est en mars 2020. Dès que la situation sanitaire le permettra, les inclusions débuteront. Par ailleurs, le génotype associé sera étudié de manière à établir ou invalider la possibilité de prédire un phénotype déficient à partir du génotype.

🧠 2019. En prévision de ce projet, une étudiante canadienne en 2^{ème} année de licence a mis au point le génotypage d'une partie du gène G6PD durant ses quatre mois de stage. Elle a réussi à amplifier une grande partie du gène codant la G6PD qui est très long, plus de 15Kb. Reste à mettre au point l'analyse de l'exon 1 de ce gène.

🧠 2020. Au cours du dernier trimestre 2020, une étudiante en 5^{ème} année de pharmacie a finalisé la mise au point du génotypage des premiers exons et aussi développé une méthode de génotypage à partir de l'analyse de l'ADN complémentaire.

Méthode de détection des porteurs de gamétocytes par PCR en temps réel

Porteur du projet : L. Musset
Collaboration : T. Bousema
Financement : SPF

🔗 De part ses missions de santé publique, le laboratoire intervient en tant qu'expert de la question du paludisme dans des dossiers de patients dont le diagnostic du paludisme est délicat, en microscopie ou par les tests rapides. Dans le cadre de la lutte contre cette pathologie et son élimination, il réalise également des PCR de diagnostic de manière à détecter les porteurs asymptomatiques susceptibles de transmettre le paludisme dans une zone. Pour étoffer sa palette de méthodes, nous envisageons de développer une méthode de détection des porteurs de gamétocytes que cela soit pour *P. falciparum* ou pour *P. vivax*. Ce développement se fera en collaboration avec l'équipe de Teun Bousema, de Radboud University Medical Centre aux Pays Bas spécialiste de la transmission du paludisme et de la biologie des gamétocytes.

Caractérisation des zones de transmission gyanaises et actions

🔥 Avec la diminution du nombre de cas depuis plusieurs années, les poches résiduelles de transmission s'amenuisent et il est fondamental, dans un objectif d'élimination, de les caractériser afin de mieux les cibler. Entre 2007 et 2014, alors que j'étais responsable adjointe du laboratoire, le CNR participait à la caractérisation des foyers épidémiques tels que celui de Saül investigué en 2009 et qui sera évoqué plus bas. Depuis 2015, j'ai inclus dans la stratégie de recherche du laboratoire un volet dédié aux zones de transmission. En effet, les connaître c'est pouvoir apporter des données chiffrées et des éléments factuels aux autorités de santé pour mieux les cibler même si elles concernent des populations sensibles. Je pense notamment ici à la question de la transmission du paludisme en zones orpaillées qui est une question très délicate en Guyane puisqu'elle touche des zones où des personnes ne sont pas supposées être sur le territoire, travaillent sans autorisation et où la France engage d'importants moyens pour limiter voire éliminer ces activités. Comment agir dans de telles zones, très éloignées, dispersées, qui sont supposées ne pas exister lorsqu'on est décideur de santé publique et que par ailleurs les moyens sont déjà très limités pour délivrer du soin en zone dite « normale » ? Rajouter à cela les réactions vives des populations locales qui adhèrent peu aux soins prodigués aux populations clandestines malgré le risque infectieux qui en découle. Il y a donc eu pendant plusieurs années un certain déni de la problématique du paludisme et de l'orpaillage. Le travail de longue haleine que j'ai pu mener en collaboration avec mes collègues travaillant sur cette même thématique avait pour objectif de pousser cette question tout en essayant de comprendre les problématiques de chacun et de trouver un consensus acceptable pour tous. Ainsi, après 10 ans d'engagement dans cette voie, je pense que l'on a passé avec succès plusieurs étapes : i) prouver et faire accepter l'idée que orpaillage et paludisme sont intimement liés sur le plateau des Guyanes, ii) intégrer ces zones et ces populations dans les stratégies de lutte, et enfin, iii) évaluer des méthodes innovantes de prise en charge de ces populations permettant de passer au-delà des nombreuses limitations, réglementaires, financières et politiques dans l'objectif de diminuer la transmission et protéger le plus longtemps possible les molécules efficaces.

Au-delà des zones orpaillées, le paludisme se transmet encore largement le long de l'Oyapock et dans quelques villages du Haut Maroni. Saint Georges de l'Oyapock est une commune où le nombre de cas dans certains quartiers est particulièrement important. Pour le différencier du paludisme en zone orpaillée, il est localement dénommé « paludisme autochtone ». Aussi, en collaboration avec l'Hôpital de Cayenne et ses Centres Délocalisés de Prévention et de Soins, nous avons monté un projet de recherche opérationnel visant à tester une approche de dépistage actif suivi d'un traitement systématique des porteurs.

Toutes ces actions de terrain n'ont été menées et possibles que grâce à une approche multidisciplinaire où plusieurs acteurs aux compétences complémentaires ont été impliqués. Mes deux partenaires majeurs sur ce type d'actions sont le Centre d'Investigation Clinique (CIC) et l'Hôpital de Cayenne.

Paludisme et orpaillage en Guyane

Les premières constatations au cours de l'épidémie de Saül, novembre 2008

Investigation : Cire Antilles-Guyane
CNR du paludisme
Direction de la Démoustication et de l'Action Sociale, Département de la Guyane
Unités d'Entomologie Médicale et d'Epidémiologie de l'Institut Pasteur de la Guyane


🔥 A la suite d'une augmentation significative, fin 2008, du nombre de cas recensés à Saül, un village du centre de la Guyane, une investigation entomo-épidémiologique a été initiée en janvier 2009. Son objectif était de décrire l'épidémie et d'identifier les facteurs de risques environnementaux et comportementaux.


Du 14 au 16 janvier 2009, une enquête de cohorte rétrospective portant sur l'ensemble des habitants a été menée. Quatre binômes d'investigateurs ont travaillé sur un total de neuf secteurs de résidence définis à partir d'une photographie aérienne. Des informations sur les accès survenus entre le 30 juin et le 31 décembre 2008 (dates, signes cliniques, espèce parasitaire...) ont été renseignés pour chacun des habitants. Les sujets ont été interrogés sur les moyens de prévention individuels et collectifs mis en œuvre. Enfin, les lieux fréquentés en dehors du bourg de Saül durant la période d'étude ont été demandés. Soixante huit habitants ont été interrogés sur un total estimé à 74. L'âge médian était de 39 ans (extrêmes : 1-83), le sex-ratio de 1,3. Au total, 48 sujets ont présenté entre un et cinq accès palustres durant les 19 semaines de la période d'étude,

soit un taux de densité d'incidence de 7% personne/semaine (92 accès). *P. falciparum* représentait 59% des accès (54/92). L'analyse des données n'a pas permis d'identifier de lieu à risque, dans le bourg de Saül ou dans ses environs. Cependant, le poste de santé recevait de nombreux orpailleurs eux même impaludés pour consultation. Lors de leur séjour dans le bourg, ils ont ainsi pu initier une chaîne de transmission qui n'a ensuite pas tardé à toucher bon nombre des habitants du village.

L'étude de la chimiosensibilité des isolats provenant de Saül sur la même période n'a pas permis d'identifier de résistance aux 11 molécules testées sur 14 isolats.


L'enquête entomologique, exploratoire puisqu'aucune information récente n'était disponible sur l'anophélisme dans la région de Saül, a reposé sur des captures sur Homme et des prospections larvaires dans le bourg et ses environs. La présence, dans le bourg, de formes adultes et larvaires d'*Anopheles darlingi* a été confirmée. Dans le bourg et les alentours du village, des larves d'anophèles d'autres espèces ont été collectées dans différents types de gîtes naturels et anthropiques.

 **P9.** Berger F, Flamand C, **Musset L**, Djossou F, Rosine J, Sanquer MA, Dusfour I, Legrand E, Ardillon V, Rabarison P, Grenier C, Girod R. Investigation of a sudden malaria outbreak in the isolated Amazonian village of Saül, French Guiana, January-April 2009. *Am J Trop Med Hyg*, **2012**. 86: 591-597. IF n+2: 2.70. DOI: [10.4269/ajtmh.2012.11-0582](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0582).

 **P5.** Berger F, Girod R, Grenier C, Djossou F, Rosine J, Ardillon V, Ruello M, Sanquer MA, Besançon L, **Musset L**, Flamand C. Recrudescence de paludisme à Saül, Guyane, 2008. *BVS Antilles-Guyane*, **2009**. 11: 2-4.

ORPAL confirme une situation inquiétante mais hétérogène dans les zones orpaillées

Porteur de projet : M. Douine, CIC Guyane
Collaborations : Ministère de la santé du Suriname
Association SWOS
Financements : FEDER

🔥 Pendant quelques années à la suite de cette investigation de Saül, le dialogue avec les autorités sanitaires était délicat sur ce sujet. Compte tenu des implications politiques, réglementaires et de l'impact que cela pouvait avoir auprès de la population locale, il était difficile pour eux de reconnaître que paludisme et orpaillage (essentiellement clandestin en Guyane) étaient liés. Dans le même temps, nos partenaires surinamais s'impatientaient de plus en plus vis-à-vis de l'attentisme français et répétaient à qui voulait l'entendre qu'en Guyane les orpailleurs n'avaient pas accès aux soins et que la France ne faisait rien pour prendre en compte cette situation si ce n'était, d'exporter des cas sur leur territoire. L'expérience de tous les acteurs de santé de Guyane était pourtant claire, les patients atteints de paludisme revenaient pour beaucoup, voire pour tous, de zones orpaillées. Maintenant, aucune donnée chiffrée n'était disponible si ce n'est celles liées à l'épidémie de Saül en 2008. Aussi, en 2014, le service de santé des Armées, lui-même confronté à cette question via les militaires qui revenaient d'opérations Harpie très impaludés, décida de se rendre sur le site d'orpaillage Eau Claire pour une investigation entomo-épidémiologique. Ainsi, plus de 200 orpailleurs ont été prélevés et diagnostiqués. Une prévalence de 48,3% de porteurs de plasmodies y a été observée ( **P26.** Pommier de Santi et *al.*, 2016).

Dans le même temps, le projet ORPAL, porté par le CIC en collaboration avec notre CNR, a été financé par les fonds de développement régionaux, FEDER. Son objectif était d'évaluer la prévalence du portage asymptomatique de plasmodies sur les sites d'orpaillage de manière globale et non sur un site en particulier. Le deuxième objectif était de recueillir des données sur les connaissances/attitudes/pratiques des orpailleurs vis-à-vis du paludisme.

Pour ce faire, entre janvier et juin 2015, 421 personnes ont été incluses dans l'étude et recrutées sur les bases de repli, lieux de repos et d'approvisionnement des orpailleurs sur la rive surinamaïse du fleuve Maroni. Etaient inclus, les orpailleurs travaillant en Guyane, majeurs et présents sur le site de repli depuis moins de 7 jours (période minimale d'incubation du paludisme). Un test de diagnostic rapide du paludisme était réalisé sur place et un traitement donné gratuitement s'il était positif. Un prélèvement sanguin était réalisé pour examen microscopique et PCR à Cayenne. Un questionnaire recueillait des données socio-démographiques, de mode de vie sur les sites d'orpaillage, et les connaissances, attitudes et pratiques des orpailleurs vis-à-vis du paludisme. Les autorisations éthiques et réglementaires ont été obtenues en France et au Suriname.

La moyenne d'âge des personnes incluses était de 37 ans [30-45], dont 70,6% d'hommes en grande majorité brésiliens de nationalité (93,8%). La prévalence de portage de *Plasmodium spp.* était de 22,3% en moyenne, dont 84,0% étaient asymptomatiques (absence de fièvre dans les 48h précédant l'inclusion).

Après regroupement en 10 zones des 68 sites d'orpaillage, la prévalence variait de 3,8% à 46,4% (Figure 18). La région la plus impaludée était située autour de Maripa Soula venant confirmer les chiffres obtenus au cours de la mission à Eaux Claires précédemment citée. L'hétérogénéité de la prévalence de portage entre les zones orpaillées était importante et venait confirmer ce qui était observé dans les CDPS situés non loin de ces zones. Certaines zones ne faisaient pas l'objet d'une transmission majeure bien qu'elles soient orpaillées.

Lors du dernier épisode de paludisme, 53,7% des personnes interrogées déclaraient s'être automédiquées, en raison de l'éloignement des structures de soin. Les traitements utilisés en automédication contenaient dans 90% des cas des dérivés de l'artémisinine essentiellement la spécialité Coartem® incluant DHA-pipéraquline-triméthoprime. L'observance déclarée était bonne dans 60% des cas. Après analyse multivariée, le fait d'être en Guyane lors de l'épisode de paludisme et d'être sur ce territoire depuis au moins 3 ans étaient associés à l'automédication (OR=27,8 IC₉₅ [9,5 - 81,6] et OR=2, IC₉₅ [1,1 - 3,5], respectivement).

L'automédication fréquente et incomplète avec des dérivés de l'artémisinine laissait craindre l'apparition de résistance à ces molécules. Cependant, l'analyse du gène en lien avec la résistance aux dérivés de l'artémisinine (*pfK13*) n'a pas permis de mettre en évidence de mutations sur les 31 échantillons analysables. Six isolats ont pu être phénotypés à l'aide du test RSA. Un isolat présentait un taux de survie de 2,7%, ce qui suggère une diminution de la sensibilité vis-à-vis de ces molécules sans mutation au niveau du gène *pfk13*.

🔥 Les orpailleurs étaient donc effectivement bien impaludés, et à un niveau très important dans les zones d'exploitation situées entre Saül et Maripa Soula. Il s'agit là des zones où les personnes travaillent dans sur des sites très éloignées des centres de diagnostic et de soins. Aussi, dans ces zones, ces populations devraient faire l'objet d'actions de santé publique prioritaires.

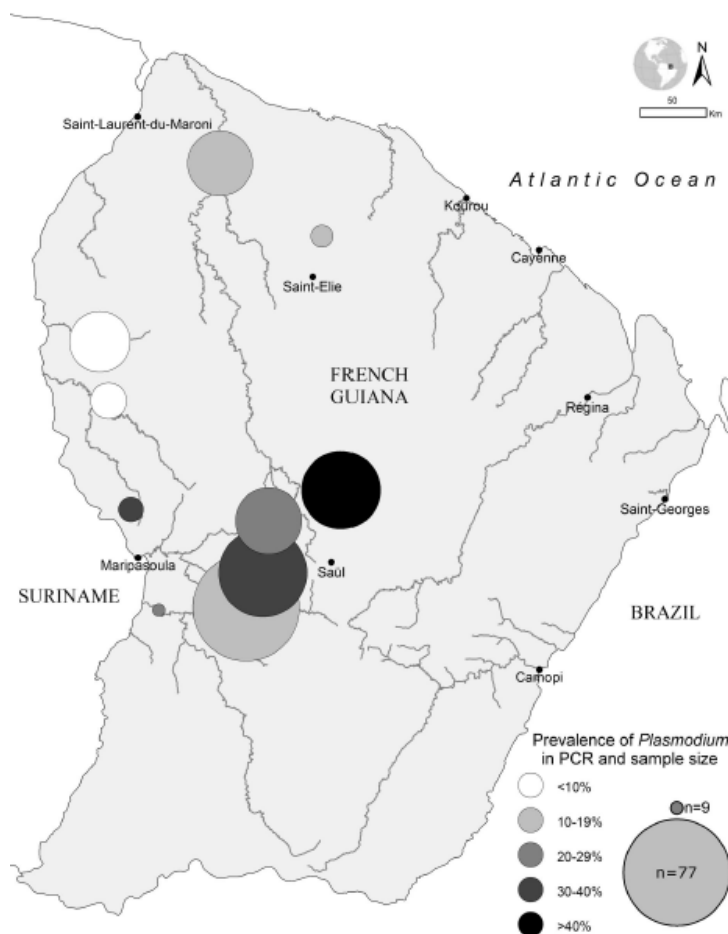


Figure 18. Prévalence du portage à *Plasmodium spp.* chez les orpailleurs travaillant en Guyane, 2015.

📖 **P27.** Douine M, **Musset L**, Corlin F, Pelleau S, Pasquier J, Mutricy L, Adenis A, Djossou F, Brousse P, Perotti F, Hiwat H, Vreden S, Demar M, Nacher M. Prevalence of *Plasmodium spp.* in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. *Malar J*, **2016**. 15: 315. IF n+2: 2.85. DOI: [10.1186/s12936-016-1367-6](https://doi.org/10.1186/s12936-016-1367-6).

📖 **P36.** Douine M, Mosnier E, Le Hingrat Q, Charpentier C, Corlin F, Hureau L, Adenis A, Lazrek Y, Niemetsky F, Aucouturier AL, Demar M, **Musset L**, Nacher M. Illegal gold miners in French Guiana : a neglected population with poor health. *BMC Public Health*, **2017**. 18: 23. DOI: [10.1186/s12889-017-4557-4](https://doi.org/10.1186/s12889-017-4557-4).

📖 **P37.** Douine M, Lazrek Y, Blanchet D, Pelleau S, Chanlin R, Corlin F, Hureau L, Volney B, Hiwat H, Vreden S, Djossou F, Demar M, Nacher M, **Musset L**. Predictors of antimalarial self-medication in illegal gold miners in French Guiana: a pathway towards artemisinin resistance. *J Antimicrob Chemother*, **2018**. 73: 231-239. DOI: [10.1093/jac/dkx343](https://doi.org/10.1093/jac/dkx343).

📖 Douine M, **Musset L**, Corlin F, Pelleau S, Mutricy L, Adenis A, Mosnier E, Djossou F, Hiwat H, Demar M, Nacher M. Malaria and illegal gold mining in French Guiana: A major public health challenge. *Bull Epid Hebd*, **2017**. 6: 102-109.

👤 **2019.** Le dépistage des porteurs asymptomatiques par PCR a été effectué avec l'aide d'une étudiante en 1^{ère} année de DUT génie biologique.

MALAKIT, une étude pilote sur une approche innovante d'autotest et autotraitement du paludisme

Porteur de projet : M. Douine, CIC Guyane

Collaborations : Ministères de la santé du Brésil, du Suriname, de la France

Etat d'Amapa

ARS Guyane

Associations DPAC et SWOS

Fiocruz

Financements : Interreg, ARS Guyane, Fond Mondial, Programmes nationaux, PAHO, CTG, AFD

🔥 Sur la base des chiffres obtenus lors des études ORPAL et Eaux-Clares, de nombreuses approches pour tenter de cibler cette population ont été discutées. Tout d'abord, envoyer des soignants sur les sites orpaillés. Impossible à bien des égards : le coût d'une telle approche, la difficulté d'envoyer suffisamment de monde en même temps pour espérer diminuer la transmission dans des zones dispersées et environnementalement hostiles et dont on ne connaît pas officiellement la localisation. Déployer en collaboration avec les orpailleurs, des agents de santé formés au diagnostic et au traitement du paludisme comme cela se fait au Suriname dans le cadre de leur programme de lutte « Looking for gold, finding malaria », et qui commence à être déployé au Guyana. Impossible en France car seuls les personnels de santé peuvent diagnostiquer et traiter.

Par ailleurs, comment « légitimer » certaines personnes sur des sites d'orpaillage qui peuvent être démantelés d'une minute à l'autre par les opérations Harpie ? Finalement, la solution acceptable à tout point de vue et qui selon nous méritait d'être évaluée, vise à distribuer des kits d'autodiagnostic et d'auto-traitement aux personnes vivant dans ces zones reculées et de les former à la réalisation de ces tests et la prise d'un traitement complet, en cas de positivité uniquement. La finalité de cette approche est double : i) limiter les traitements présomptifs et la prise aléatoire et non contrôlée d'antipaludiques et, ii) si la distribution atteint une couverture suffisante, diminuer le niveau de transmission dans ces zones.

C'est ainsi que l'étude internationale MALAKIT, innovante et ambitieuse a vu le jour. Nous avons créé un kit d'autodiagnostic et d'autotraitement du paludisme appelé « Malakit », qui a été remis aux orpailleurs après une formation à sa bonne utilisation d'environ une heure (Figure 19). Entre avril 2018 et décembre 2020, 4 259 kits ont été distribués au niveau des zones de replis situées côtés Suriname et Brésil soit 3 471 personnes incluses (Figure 19). Au cours de la distribution, une méthodologie scientifique rigoureuse a été mise en place avec un recueil de données de suivi au fil de l'eau et une étude transversale à la fin de la distribution, comparable à ORPAL afin de voir si les attitudes et les pratiques ont été modifiées par cette distribution.



Figure 19. Antonio do Brinco à la frontière entre le Suriname et la Guyane, lieu de distribution de Malakit.

L'ensemble des données descriptives et de connaissances attitudes et pratiques obtenues dans le cadre des études ORPAL (n=1 098) a permis de montrer un sexe-ratio à 3 et un âge moyen des orpailleurs de 38,8 ans [16-70]. Il a également été estimé que 5,2% des personnes présentes sur site d'orpillage sont des enfants. Les personnes sont à 97% nées au Brésil et pour 54% d'entre elles dans l'état du Maranhão, 22% dans l'état du Pará et 11% dans l'Amapá. Plus de 96% des personnes interrogées ne possédaient pas de couverture sociale française. Cela faisait en moyenne plus de 11 ans [4-16] qu'ils travaillaient dans l'orpillage et en moyenne six mois sur un même site. Il semblerait que les orpailleurs se déplacent moins pour ceux qui ont été inclus côté Oyapock par rapport à ceux qui travaillent côté Maroni. Trois quart des personnes n'ont pas une activité qui impose une mobilité fréquente mais les orpailleurs quittent leur site environ tous les trois mois côté Maroni, six mois côté Brésil. La période de Noël est particulièrement propice aux mouvements. Ils pouvaient avoir travaillé au maximum dans 31 sites différents et ont besoin de plus d'une journée pour rejoindre leur site de travail respectivement pour 36,7% d'entre eux côté Maroni et 65,6% côté Oyapock. Plus de la moitié (55,6%) travaille en extraction alluvionnaire.

Le concept de Malakit a été bien accepté et les distributions présentaient une meilleure efficacité de contact avec le médiateur lorsqu'elles étaient actives, et que ces derniers allaient vers les personnes cibles. Il a été montré que le recours aux antipaludiques issus du marché noir a été diminué par 2 (OR=0,6, IC_{95%} [0,3-0,9]) suite à la distribution Malakit. Le recours aux traitements « officiels » (centres de soins ou Malakit) a augmenté d'autant (OR=1,8, IC_{95%} [1,1-3,0]). Cependant, pour un certain nombre, cela a aussi diminué le recours au système de soins au profit de Malakit. La réalisation de TDR a été analysée et 91% des personnes formées le réalisait correctement et l'ont effectué avant de prendre un traitement. L'observance n'était pas différente avant et après la distribution mais toujours meilleure lorsque le traitement était délivré par un centre de soins (92%) ou *via* Malakit (82%). Ainsi, 72,4% des personnes ont pris un traitement correct après un test TDR positif IC_{95%} [66,9-77,9]. En revanche, 25,5% IC_{95%} [19,4-31,7] des personnes ont tout de même pris un traitement malgré un TDR négatif. Le niveau de connaissance sur le paludisme a peu varié avant et après Malakit mais les personnes ont bien intégré qu'il faut faire le test avant de prendre le traitement (91,5% IC_{95%} [88,1-94,9]). Cependant, les informations relatives à la posologie et à la durée du traitement ont été plus faiblement assimilées, 61,6% IC_{95%} [55,7-67,6].

En 2015, ORPAL rapportait une prévalence moyenne du paludisme de 22,3% IC_{95%} [18,3-26,3] contre 5,3% IC_{95%} [3,0-7,5] observée fin 2019 au cours d'ORPAL post distribution qui incluait 380 orpailleurs sur le Maroni et 199 côté Oyapock. Ces résultats sont cependant à analyser avec précaution puisque sur la même période, la transmission du paludisme a globalement diminué partout. Une analyse est en cours pour évaluer l'impact direct de cette approche sur la transmission du paludisme en forêt. La proportion de *P. vivax* a augmentée entre les deux études (42% vs 75%), ce qui est le signe d'une meilleure prise en charge puisque *P. falciparum* a reculé. Les reviviscences à *P. vivax* sont probablement à l'origine de cette inversion puisque les traitements fournis dans le kit n'incluaient pas de primaquine à visée anti-hypnozoitaire. Cette approche a cependant quelques limites : 34% des kits ont été donnés ou vendus après inclusion mais à la suite de cela, 66,7% IC_{95%} [53,7-79,6] des personnes les ont tout de même correctement utilisés. Globalement, 64% des orpailleurs interrogés en fin de distribution avaient entendu parler de Malakit, y compris dans les sites les plus reculés, et

77% voyaient un intérêt à cette approche. Sur la base de ce résultat, le nombre global d'orpailleurs a été estimé à 11 600 personnes.

L'analyse des premiers résultats de MALAKIT et ORPAL post distribution est toute récente et la valorisation des résultats par des publications ne fait que commencer. La présentation de l'approche ainsi que de nombreuses revues sur le paludisme en zone orpaillée ont tout de même été publiées. De nombreuses présentations orales ont également été faites de manière à expliquer cette approche, certes innovante, mais qui peut être déroutante si on ne connaît pas bien le contexte qui le sous-tend.

Le laboratoire a été partie prenante dans cette aventure d'amélioration de la prise en charge du paludisme en zone orpaillée. Pour avoir participé aux discussions autour de cette question depuis le début, ce projet est le fruit de nombreuses années de concertation, de persuasion des autorités pour obtenir l'adhésion de tous puis une confiance mutuelle (acteurs de santé, financeurs et autorités) tissée au fil du temps pour oser monter et mener à bien ce projet. Je pense que mon expertise de la question du paludisme et de son contexte « plateau des Guyanes » (📖 R2) avec les limites réglementaires et politiques en France a été importante pour aider à concevoir cette approche et tenter de trouver la solution la plus adaptée à cette population, et la tester. D'un point de vue biologique et scientifique, nous avons réalisé les PCR de diagnostic et analyser avec attention des discordances observées entre les TDR sur le terrain et les résultats de PCR. Ce projet a été une belle aventure humaine et a prouvé qu'avec de la volonté, de l'initiative et de la persévérance, il est possible de faire bouger les lignes en prenant, aux moments opportuns, des risques et de l'initiative.

📖 P38. Douine M, Sanna A, Galindo M, **Musset L**, Pommier de Santi V, Marchesini P, Magalhaes ED, Suarez-Mutis M, Hiwat H, Nacher M, Vreden S, Garancher L. Malakit: an innovative pilot project to self-diagnose and self-treat malaria among illegal gold miners in the Guiana Shield. *Malar J*, 2018;17(1):158. IF n+2: 2.71. DOI: [10.1186/s12936-018-2306-5](https://doi.org/10.1186/s12936-018-2306-5).

📖 R3. Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, 2020;7(2):37-47. IF n-2: 0.92. DOI: [10.1007/s40475-020-00202-5](https://doi.org/10.1007/s40475-020-00202-5).

📖 R5. Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, 2020;7(2):37-47. IF n-2: 0.92. DOI: [10.1007/s40475-020-00202-5](https://doi.org/10.1007/s40475-020-00202-5).

Paludisme et transmission hors zones orpaillées ou paludisme dit autochtone

🔹 Au-delà de la transmission en zone orpaillée, le paludisme, surtout à *P. vivax*, touche également des populations locales vivant le long des fleuves frontalières, le long de l'Oyapock et la zone du Haut Maroni. La transmission observée y est généralement saisonnière avec une recrudescence du nombre de cas observés entre septembre et janvier. Aussi, en partenariat étroit avec l'Hôpital de Cayenne, nous avons choisi en 2015 de caractériser la transmission du paludisme dans la région du bas Oyapock, sur la commune de Saint Georges de l'Oyapock.

Dépistage actif et traitement du paludisme à *P. vivax* en Guyane : faisabilité et acceptabilité ?

Porteur de projet : E. Mosnier, infectiologue, Centres Dlocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne

Financement : ARS Guyane

En 2015, nous avons réalisé notre première étude transversale en période inter-épidémique dans un quartier relativement éloigné (10 minutes de Pirogue) de Saint de Georges de l'Oyapock, Blondin. Au cours de cette étude préliminaire, 58 des 63 habitants du quartier ont été inclus. La moyenne d'âge était de 23,3 ans [2 mois - 72 ans] et le sexe-ratio homme/femme de 0,56. Soixante quatorze pour cent (n = 43/58) de la population d'étude déclaraient au moins un antécédent palustre au cours de leur vie, dont 12 % (n = 7/58) au cours de l'année précédente. Tous les tests de diagnostic rapide du paludisme étaient négatifs. Le diagnostic de paludisme par PCR avait permis d'identifier deux porteurs asymptomatiques : un enfant porteur de *P. vivax* et un adulte porteur de *P. falciparum*. Cela représentait une prévalence totale de 3,6% IC₉₅ [0,00 – 8,14]. Ces deux patients ont été traités et n'ont pas développé d'accès palustre symptomatique dans les huit mois qui ont suivi.

Cette première étude nous a permis de mettre en évidence un très bon niveau de participation de la population et d'évaluer les ressources nécessaires à la mise en place d'une approche de dépistage plus large sur la commune. Pour rappel, cette commune est située à l'est de la Guyane, à la frontière avec le Brésil, à 188 km, environ 2h30 de route de Cayenne. Cette route, la nationale 2, est en service depuis 2008.

P35. Mosnier E, Douine M, Epelboin L, Pelleau S, Pommier de Santi V, Dangel Y, Demar M, Mutricy R, Guarmit B, Nacher M, Brousse P, Davy D, Djossou F, **Musset L.** Asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *vivax* infection in the neighborhood of Blondin, Saint-Georges-de-l'Oyapock District, French Guiana. *Bull Soc Pathol Exot*, **2017**;110(4):265-9. DOI: [10.1007/s13149-017-0572-z](https://doi.org/10.1007/s13149-017-0572-z).

2019. Le dépistage des porteurs asymptomatiques par PCR a été effectué avec l'aide d'une étudiante en 1^{ère} année de DUT génie biologique.

PALUSTOP : Prévalence du paludisme à St Georges de l'Oyapock (Axe 1 du projet Elimalar)

Coordinatrice ELIMALAR : L. Musset
Coordinatrice PALUSTOP : E. Mosnier, Centres Délocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne
Participants au projet : O. Moriceau, Y. Lazrek, E. Roux, M. Gaillet
Collaborations : Association DAAC
IRD Espace-dev

Description succincte de l'étude

Suite à l'étude de Blondin, la bonne acceptabilité de la population nous a permis d'envisager un projet de plus grande envergure. Ainsi, au sein du projet ELIMALAR décrit en préambule de ce document (p.50), nous avons développé un axe dédié au dépistage actif du paludisme suivi d'un traitement ciblé de l'ensemble des porteurs de parasites. PALUSTOP, nom donné à ce projet, se voulait plus global et au-delà du dépistage et du traitement, incluait :

- une approche de santé communautaire visant à mieux comprendre les connaissances, attitudes et pratiques de la population vis-à-vis du paludisme,
- l'élaboration d'outils d'éducation à la question du paludisme adaptés aux communautés,
- une analyse des connaissances et usages relatifs à l'utilisation de plantes médicinales,
- une étude des vecteurs présents sur site.

Nous avons donc cherché à caractériser le réservoir parasite présent à Saint Georges de l'Oyapock en conduisant une enquête transversale avant-après entre octobre et décembre 2017 et 2018 auprès de 36% (n=1549/4355) des habitants de la commune. Les quartiers de St Georges présentant la plus forte incidence dans les deux ans auparavant ont été ciblés (Figure 20).

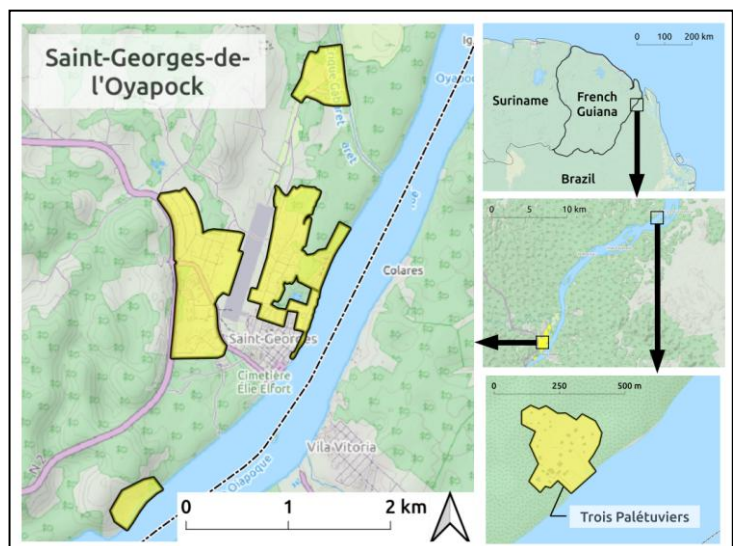


Figure 20. Quartiers ciblés par les campagnes de dépistage actif (en jaune), PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018.

Ce dépistage a été effectué en 42 jours en déployant des postes avancés de prélèvement, au plus près de la population. Des tandems infirmier/médiateur en santé issus des communautés avaient pour mission de sensibiliser la population, de réaliser les enquêtes connaissances/attitudes/pratiques (CAP), soit environ 120 questions posées aux habitants, et les prélèvements. Lorsqu'une personne positive était identifiée, un traitement incluant de la primaquine à distance pour les porteuses de *P. vivax* était administré par un infectiologue. Le dosage en G6PD a été effectué pour l'ensemble de la population. Les résultats ont ensuite

été renseignés dans les dossiers patients du centre de santé afin de gagner du temps dans l’administration de primaquine lors d’un prochain accès palustre, même hors projet PALUSTOP. Les maisons ont également été géoréférencées. La démographie, les antécédents médicaux enregistrés et analysés par grappes géographiques (SaTScan). La prévalence de *Plasmodium spp.* a été mesurée par TDR et PCR et une analyse multivariée des facteurs de risque conduite.

Prévalence observée dans les différents quartiers

La PCR a montré que 100 des 1 501 participants prélevés étaient porteurs de *Plasmodium spp.*, 90% de *P. vivax* et 10% de *P. falciparum*. La prévalence globale était de 6,7% IC₉₅ [5,4 - 7,0]. Cette prévalence s’est avérée très variable en fonction des quartiers, entre 0,0 et 29,5% (Figure 21). Trois quarts, 74% IC₉₅ [66,5 – 83,5], des infections étaient asymptomatiques et seulement 13 cas ont été diagnostiqués par TDR.

Prévalence	2017	2018	Diff	Exhaustivité
Blondin	29,5 (15,9-43,2)	2,3 (0,0-6,8)	-92%	91,7%
Trois-Palétuviers	26,1 (19,6-32,5)	7,2 (3,4-11,0)	-72%	98,9%
Adimo	7,5 (2,4-12,6)	6,4 (1,8-11,0)	-15%	41,7%
Philogène	6,5 (0,9-12,0)	0,0 (0,0-3,9)	-100%	90,6%
Village Martin	5,7 (2,0-13,5)	12,0 (0,0-24,7)	+110%	42,3%
Esperance	1,9 (0,0-3,9)	1,6 (0,0-3,5)	-16%	55,8%
Crique Onozo	3,0 (0,8-5,3)	1,5 (0,0-3,3)	-50%	53,5%

Figure 21. Prévalence par PCR de *Plasmodium spp.*, Saint Georges de l’Oyapock, 2017 et 2018.

Facteurs de risque associés au portage de plasmodies en 2017

L’analyse multivariée a mis en évidence qu’un âge supérieur à 15 ans (et plus particulièrement la tranche 15-24 ans), vivre dans des quartiers reculés, l’anémie ou encore la thrombopénie étaient indépendamment associés à une probabilité accrue de portage de *Plasmodium spp.*. Ainsi, le risque de portage était significativement plus élevé dans trois quartiers (Trois Palétuviers: RR = 7,16, p <0,01 ; Blondin: RR = 5,15, p = 0,002 et Adimo: RR = 12,43, p = 0,046). Ces quartiers sont situés près de la forêt et éloignés du centre de santé.

P41. Mosnier E, Roux E, Cropet C, Lazrek Y, Moriceau O, Gaillet M, Mathieu L, Nacher M, Demar M, Odonne G, Douine M, Michaud C, Pelleau S, Djossou F, **Musset L.** Prevalence of *Plasmodium spp.* in the Amazonian border context (French Guiana-Brazil): Associated factors and spatial distribution. *Am J Trop Med Hyg*, 2020;102(1):130-41. IF n-1: 2.25. DOI: [10.4269/ajtmh.19-0378](https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0378).

Evaluation de l’impact de l’intervention de 2017

En 2018, les mêmes personnes ont été contactées et prélevées à nouveau. La prévalence générale du portage de plasmodies avait alors diminuée de 54% pour atteindre 2,9% IC₉₅ [1,9 - 3,9] (p<0,001). La proportion de *P. falciparum* était légèrement plus importante (17%). Pendant la période écoulée entre la première intervention et la deuxième, le nombre de cas symptomatiques a également significativement diminué passant de 6,1% à 2,7% (p<0,05). Il est donc difficile de dissocier l’impact de l’intervention des variations épidémiques observées mais il semblerait que cette approche ait eu un impact sur la transmission puisque cette diminution est moins élevée chez les personnes des mêmes quartiers n’ayant pas participé à l’étude. L’impact est très certainement majoritairement lié au traitement systématique par primaquine des patients atteints par *P. vivax* ce qui est peu effectué en temps normal faute de temps, d’accès au diagnostic G6PD et du fait de l’éloignement des patients de la structure de soin qui rend leurs rendez-vous multiples difficiles. Le déploiement d’une méthode de dosage de la G6PD rapide et performante au centre de santé de Saint Georges devrait améliorer en partie la situation (cf p.63).

Connaissances et pratiques de la population, mieux les connaître afin de les améliorer

Au cours de la campagne de dépistage actif « PALUSTOP » de 2017, une enquête attitudes et pratiques a également été conduite. Les résultats de cette enquête ont montré des connaissances sur le paludisme limitées (Figure 22).



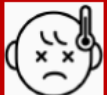
Questions posées	Réponse « Non »	N (%)
Concernant les moyens de prévention		
« les traitements peuvent-ils prévenir le paludisme ? »	791 (93,7%)	
Concernant les recours thérapeutiques		
« les médicaments peuvent-ils guérir le paludisme ? »	221 (26,2%)	
Concernant les modes de transmission		
« Les moustiques transmettent ils le paludisme ? »	227 (26,9%)	
Concernant les symptômes du paludisme		
« la fièvre est-elle un symptôme du paludisme ? »	451 (53,4%)	

Figure 22. Pratiques vis-à-vis du paludisme, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.

Ce niveau de connaissances était d'autant plus limité que les personnes interrogées étaient jeunes (moins de 25 ans, $p = 0,013$), qu'elles vivaient dans un quartier amérindien éloigné ($p < 0,001$) ou que leur activité était agriculteur, retraité ou sans emploi ($p < 0,001$). Le bon niveau de connaissances était lui associé au fait de parler brésilien ($p < 0,001$) ou d'avoir accès à différentes sources d'information ($p < 0,001$).

L'étude de la langue maternelle des individus a permis de recenser 35% de lusophones, 34% de personnes parlant une langue amérindienne, 24% de créolophones (incluant une grande partie de personnes d'origine amérindienne) et 7% de francophones (Figure 23). Ainsi, les messages en langue française ou de concept occidental avaient peu de chance d'atteindre leur cible. Nous nous sommes par exemple rendu compte que la fièvre est difficilement identifiable telle qu'on la décrit le plus souvent pour les populations de ces quartiers. De ce fait, difficile de comprendre les messages d'éducation qui disent d'aller consulter au moindre signe de fièvre.

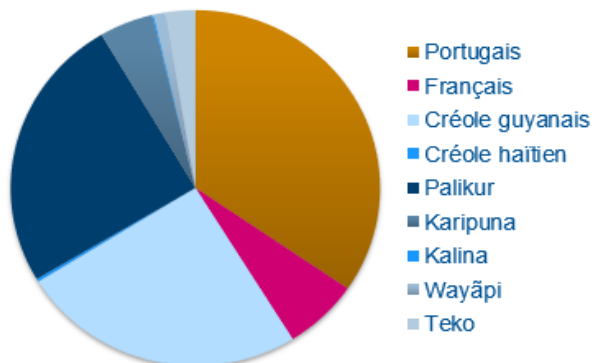



Figure 23. Langue maternelle des habitants de l'étude PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.


Au cours de cette étude, nous avons aussi testé différents outils d'éducation au paludisme tel que le théâtre forum, qui consiste à faire jouer aux participants une situation de la vie réelle en lien avec le paludisme, ou encore le photo langage, pratique qui consiste à montrer aux apprenants plusieurs images sur le thème du paludisme dans le contexte local afin de susciter la discussion et la recherche de solution collectivement. Des images animées à transmettre via les réseaux sociaux ont également été conçues et testées. Toutes les approches n'ont pas fonctionné de la même manière en fonction de l'origine culturelle ou de l'âge des participants.

 **2017.** Une étudiante en master 2, pédiatre, a été associée à la conception du questionnaire de manière à formuler clairement les questions et former de manière homogène les médiateurs qui devaient les poser. Elle a réalisé ce travail en quatre mois de stage au cours duquel elle a testé le questionnaire sur un échantillonnage de 30 personnes. Je l'ai co-encadrée avec Emilie Mosnier.

Bio-écologie des vecteurs et modalités de transmission à Trois Palétuviers

La bio-écologie des vecteurs a été conduite en collaboration avec l'unité d'entomologie médicale de l'Institut Pasteur de la Guyane dans le cadre de leur programme de recherche CONTROLE, financé également par les fonds européens régionaux FEDER. Lors de l'épidémie de 2017, 1218 anophèles ont été capturées dans le village de Trois-Palétuviers au cours de quatre missions de piégeage espacées d'un mois chacune. A 99%, il s'agissait d'*An. Darlingi*. Deux femelles uniquement ont été testées positives à *P. vivax* (prévalence = 0,16%). Ces deux moustiques infectés ont été capturés à la bordure du village, à moins de 50 mètres de la forêt. Il est ressorti des analyses conjointes des données que si tout le village est englobé dans un groupe « à risque pour les cas *asymptomatiques* de paludisme », le centre du village est significativement associé à moins de cas *symptomatiques*. Ce constat est probablement lié à la plus grande densité d'*An. darlingi* en bordure de village qu'au centre. Ainsi, les habitants de la bordure sont probablement plus exposés, et donc infectés que les autres.

Ce projet a fait l'objet de nombreuses présentations orales et affichées. Il a également été à l'origine d'une revue en français décrivant les projets de recherche opérationnelle conduits en Guyane associant une approche de santé communautaire.

 **R6.** Mosnier E, Garancher L, Galindo M, Djossou, FM, Moriceau O, Hureau-Mutricy L, Silva Barbosa R, Lambert Y, Lazrek Y, **Musset L**, Douine M. Paludisme en Guyane : des projets de recherche opérationnelle originaux s'appuyant sur la santé communautaire. *La lettre de l'infectiologue*, 2020;35(2): 50-7. [Accessible en ligne](#).

🔍 Les perspectives autour de PALUSTOP sont nombreuses et pour beaucoup déjà engagées : analyse des résultats issus de l'enquête CAP, analyse sérologique des plasmas des personnes incluses en lien avec les données individuelles associées, analyse de l'usage des plantes par les gens de l'Oyapock en cas de fièvre/paludisme, analyse de la diversité génétiques des parasites circulant dans cette zone de transmission...

Dans la suite de ce projet, le CNR souhaite également élaborer un programme d'actions d'éducation à la population basé sur l'élaboration d'un kit pédagogique à destination des primaires. L'objectif serait alors de sensibiliser l'ensemble des classes de CM₁/CM₂ des zones d'endémie tous les deux ans. Ce kit inclura différentes illustrations et outils culturellement pertinents envers le public cible pour parler du paludisme et rattacher cela aux programmes pédagogiques du cycle 3 de l'école primaire. Cette approche est en partie financée par le Rotary club international. D'autres financements seront également nécessaires.

Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017

Porteurs : E. Mosnier, infectiologue, Centres Dlocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne
Collaborations : E. Roux IRD Espace-dev

En 2017, en même temps que PALUSTOP était en cours, la Guyane, ainsi que de nombreux pays d'Amérique de Sud, a fait face à une augmentation du nombre de cas de paludisme par rapport aux années précédentes. Cette hausse a été principalement le fait d'un foyer épidémique à *Plasmodium vivax* sur la commune frontalière avec le Brésil, de St Georges de l'Oyapock (STG), entre juillet et décembre 2017. Cet accroissement a également été décrit dans les états voisins brésiliens notamment du Pará et de l'Amapá.

Au total, 219 personnes ont présenté un accès à *P. vivax* sur la période d'étude. Parmi ceux-ci, 27% (n=59) ont présenté au moins une reviviscence (survenue d'un nouvel accès TDR positif à *P. vivax* > 7 jours et < 90 jours après le dernier). L'âge médian était de 22 ans [20-24], le sexe ratio H/F de 1,23. Le taux d'attaque était de 5,5% à l'échelle de la commune allant jusqu'à 51% pour le quartier de Trois Palétuviers. Le pic épidémique a été atteint en novembre 2017 et 16% (n=31/188) des patients ayant bénéficié d'un dosage de l'activité enzymatique en G6PD présentaient une activité inférieure à la normale (N : 10-14 U/Hg/L), contre-indiquant l'administration de primaquine selon les recommandations de l'Autorisation Temporaire d'Utilisation. Elle ne pouvait donc pas être délivrée par l'ANSM. Seulement 6,9% des cas (n=13/188) présentaient un déficit intermédiaire selon l'OMS (< 8 U/Hg/L). Aucun déficit sévère n'a été retrouvé. En janvier 2018, 68% des patients avaient pu bénéficier d'un traitement complet (chloroquine et primaquine). Les enfants de moins de 18 ans et les habitants du quartier de Trois Palétuviers avaient un plus grand risque de reviviscence (p<0,005 et p=0,037). La mise en place d'une équipe comprenant des médiateurs culturels a permis d'améliorer la

couverture thérapeutique et d'atteindre 100% de prise en charge contre 10% habituellement. Les enfants sont apparus comme particulièrement à risque de reviviscences.

L'analyse conjointe des cas recensés au Brésil et en Guyane ainsi que leur temporalité d'apparition a permis de mettre en évidence la dynamique de l'épidémie. Quatre groupes de cas ont pu être identifiés dans le temps (Figure 24). Le premier est apparu côté Brésil dans la zone amérindienne de la Cabo Orange avant de toucher le centre d'Oiapoque puis de passer en France via le village de Trois Palétuviers pour ensuite toucher le bourg de St Georges. Les quartiers excentrés de St Georges, Blondin, Onozo et Espérance ont quant à eux été touchés en dernier. Les facteurs liés à la ré-augmentation des cas dans la région restent encore à déterminer même si la gestion du paludisme en zone protégée, autochtone brésilienne, l'isolement géographique, la présence d'*Anophèles darlingi* et l'emballement du foyer à Trois Palétuviers y ont possiblement contribué.

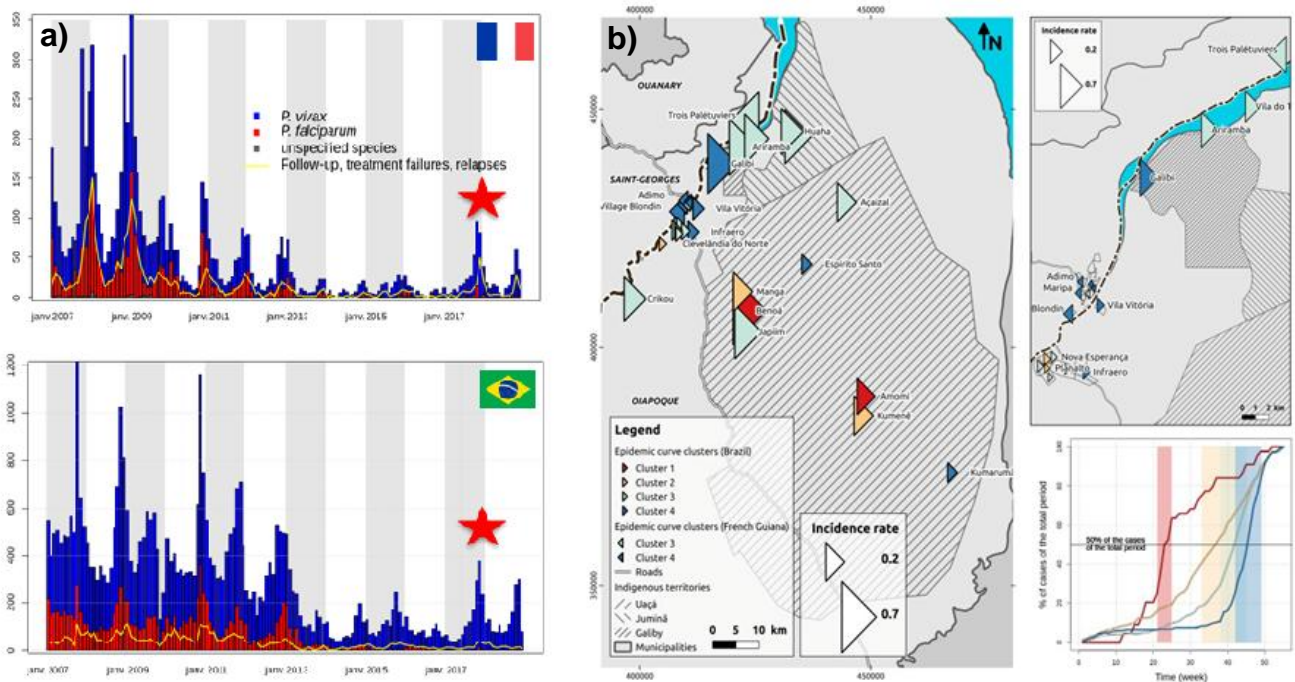


Figure 24. Caractérisation de l'épidémie de paludisme, St Georges de l'Oyapock, 2017.

- Comparaison des cas recensés à St Georges et Oiapoque entre janvier 2007 et janvier 2018
- Localisation des groupes de cas observés par zone géographique, région de la Cabo Orange puis carte centrée sur l'embouchure de l'Oyapock.
- Temporalité d'expansion des quatre groupes de cas identifiés dans le temps.

P44. Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Saldanha R, Guidez A, Gomes MS, Sanna A, Epelboin Y, Restrepo J, Davy D, Demar M, Djossou F, Douine M, Ardillon V, Nacher M, **Musset L**, Roux E. Resurgence risk for malaria, characterization of a recent outbreak in a Amazonian border area French Guiana/Brazil. *BMC Infect dis*, **2020**;20(1):373. IF n-1: 2.58. DOI: [0.1186/s12879-020-05086-4](https://doi.org/10.1186/s12879-020-05086-4).

P45. Saldanha R, Mosnier E, Barcellos C, Carbanar A, Charron C, Desconnets JC, Guarmit B, Do Socorro Mendonça Gomes M, Mandon T, Martins Mendes A, Peiter PC, **Musset L**, Sanna A, Van Gastel B, Roux E. Contributing to elimination of cross-border malaria through a standardized solution for case surveillance, data sharing, and data interpretation: development of a cross-border monitoring system. *JMIR Public Health Surveill*, **2020**;6(3):e15409. doi: [10.2196/15409](https://doi.org/10.2196/15409). PubMed PMID: 32663141.

La caractérisation des zones d'endémie guyanaises, que se soit en zones orpaillées ou le long des fleuves, a mis en évidence une vulnérabilité particulière de certains territoires vis-à-vis du paludisme, tout particulièrement ceux engendrant des retards au diagnostic du fait de l'éloignement des structures de soins. Aussi, il est majeur qu'au sein du plan de lutte contre le paludisme ces territoires et les spécificités qui les caractérisent soient prises en compte de manière à concevoir des approches innovantes, telle que Malakit, mais pas que. Si ces dernières doivent impliquer de modifier la réglementation souvent plus adaptée au contexte de la France hexagonale, charge à nous en tant que communauté travaillant sur le paludisme en Guyane, de les souligner pour déclencher les modifications requises.

SYNTHESE DES PERSPECTIVES

Tout au long de ce document, j’ai eu l’occasion de vous présenter les perspectives pour chacune de mes thématiques de recherche. Pour plus de lisibilité, j’ai également choisi de les regrouper dans le tableau suivant (Tableau 3). Les projets sont présentés par temporalité : court terme (CT) pour les actions qui pourront être réalisées d’ici à un an, moyen terme (MT) pour celles d’ici à deux/trois ans et long terme (LT) pour celles non envisageables dans l’immédiat. Le tableau vous présente de manière synthétique : les méthodes employées, les collaborations déployées ou envisagées, les financements déjà obtenus (DO) ou à demander (AD) ainsi que les financeurs potentiels. Les ressources humaines, déjà dédiées ou à envisager, sont également présentées tout comme la prochaine étape du projet.

Tableau 3. Tableau récapitulatif des perspectives de recherche en cours ou envisagées.

Thématique		Projet	Méthodes déployées	Collaboration	Financement	RH dédiées	Prochaine étape	
Résistance	Atovaquone-proguanil	LT	Transmission des mutants <i>pfcytb</i> Y268S	Infections expérimentales	Unité d'entomologie IPG UMR2016 IRD - Paris Descartes	<input type="checkbox"/> DO <input checked="" type="checkbox"/> AE	ANR ? Non	Projet à écrire
	Pipéraquine	CT	ELIMALAR - REAGIR Echecs thérapeutiques <i>in vivo</i> DHA/PI	Suivi de patients Phénotypage <i>in vitro</i> (PSA) Génotypage Dosages plasmatiques	Service de santé des armées	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	SPF Postdoctorante REAGIR - Célia	Manuscrit à finaliser
		CT	ELIMALAR - REAGIR Histoire de l'émergence, marqueurs associés et répartition en Amazonie	Phénotypage <i>in vitro</i> (PSA) Transfection Séquencage génome entier* Analyse de cluster*	Institut Evandro Chagas, Belem Fondation de Médecine Tropicale, Manaus, Brésil Ministère de la santé publique du Guyana, du Venezuela Harvard University Broad Institute	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	FEDER Guyamazon III CEBA PAHO Bioinformaticienne Broad - Angela	Analyse et manuscrit à finaliser
	Artémisinines	MT	ELIMALAR - REAGIR Vitesse et mécanismes de sélection de la résistance	Pression médicamenteuses <i>in vitro</i>	UFR de Pharmacie de Toulouse	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	FEDER SPF ROTARY Postdoctorante REAGIR - Luana	Pressions en cours, premiers séquençages entiers à venir
		CT	Efficacité thérapeutique AR/LU	Suivi de patients Phénotypage <i>in vitro</i> (RSA) Génotypage Dosages plasmatiques	UMIT – LHUPM Hôpital de Cayenne	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	SPF Non	Dernières analyses à finaliser Manuscrit à rédiger
		LT	Transmission des mutants <i>pfK13</i> C580Y et R539T	Infections expérimentales	Unité d'entomologie de l'Institut Pasteur de la Guyane Harvard University	<input type="checkbox"/> DO <input checked="" type="checkbox"/> AE	ANR ? NIH ? Non	Projet à écrire
	Luméfántrine	CT	ELIMALAR - REAGIR Caractérisation de la résistance	Pression médicamenteuses <i>in vitro</i>	UMIT – LHUPM Hôpital de Cayenne	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	FEDER Postdoctorante REAGIR - Luana	Pressions à débiter
	Evolution	MT	AMAZOMICS Evolution des populations sur le plateau des Guyanes	Séquencage génome entier* Analyse de cluster*	Harvard University Broad Institute Ministère de la santé publique du Guyana	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input checked="" type="checkbox"/> AE	FEDER CEBA NIH ? ANR ?	Analyses à approfondir
		MT	Diversité génétique de <i>P. vivax</i> en Guyane	SNP Microsatellites	Harvard University Broad Institute	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	CEBA Non	Manuscrit à finaliser
	Diagnostic	Délétion PfHRP	CT	Méthode d'étude Prévalence des délétions	PCR en temps réel et nichées	Ministère de la santé du Guyana Ministère de la santé du Venezuela	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	SPF PAHO Non
Diag multiplex		CT	Diagnostic des cinq espèces	PCR en temps réel multiplex	-	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	SPF	Manuscrit à finaliser
Dosage rapide G6PD		CT	G6PD facile	Inclusion de terrain Génotypage	LHUPM Hôpital de Cayenne	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	ARS Ingénieure de recherche Yassamine	Autorisations obtenues Inclusions à venir
Porteur de gamétocytes		MT	GAMETRANS	PCR en temps réel	Radboud University Medical Center, Pays-Bas.	<input checked="" type="checkbox"/> DO <input type="checkbox"/> AE	SPF	Méthode à mettre au point

*Méthodes déployées avec nos collaborateurs. AE : à Envisager, CT : court terme (inférieur à un an), DO : Déjà Obtenu, IPG : Institut Pasteur de la Guyane, LT : long terme (plus de 3 ans), MT : moyen terme (2-3 ans).

Tableau 3 (suite)

Thématique		Projet	Méthodes déployées	Collaboration	Financement	RH dédiées	Prochaine étape		
Elimination	MALAKIT	CT	Evaluation et limite du kit Prévalence après distribution	Porteur : CIC	■ DO □ AE	FEDER	Medecin	Valorisation des résultats	
		CT	Adaptation du kit à <i>P. vivax</i>	Primaquine – tafénoquine G6PD	Porteur : CIC	■ DO ■ AE	FEDER ?	Medecin	Montage d'une nouvelle demande de financement
	CT	Connaissances Attitudes Pratiques	Analyses en composante principale, factorielle....	CIC	■ DO □ AE	FEDER	Master 2	Valorisation des résultats	
	PALUSTOP	CT	Usage des plantes en cas de fièvre	Ethnobotanique	CNRS	■ DO □ AE	FEDER	Ethnobotaniste	Valorisation des résultats
		MT	Sérologie associées		IP Paris (I. Muellerà	■ DO □ AE	ROTARY	Ing. recherche Yassamine	Exploitation et valorisation des résultats
	Education de la population	LT	Diversité génétique de <i>P. vivax</i> en 2017 comparé en 2010	Microsatellites	IRBA Marseille	□ DO ■ AE	CEBA ?	?	Obtention des derniers résultats, analyse, valorisation
	MT	EDUPALU en milieu scolaire	Pédagogie Approche communautaire	Inkiink	■ DO ■ AE	ROTARY ARS ? FEDER ?	Equipe CNR	Demande de financement à renouveler	

*Méthodes déployées avec nos collaborateurs. AE : à Envisager, CT : court terme (inférieur à un an), DO : Déjà Obtenu, IPG : Institut Pasteur de la Guyane, LT : long terme (plus de 3 ans), MT : moyen terme (2-3 ans).

Compétences transversales

Ma boîte à outils

Au fil de ces années d'expérience professionnelle, 20 ans tout juste, en plus de mon bagage pharmaceutique et scientifique, j'ai pu élargir mon champ de compétences. Ce dernier fait de moi aujourd'hui l'actrice de la recherche et de la santé publique que je suis. J'ai pu tirer de chacune d'elles des enseignements et des compétences, tant au niveau professionnel que personnel. Les plus importants sont listés par ordre chronologique d'acquisition dans les pages suivantes :

- Surveillance et expertise en santé publique,
- Construction et animation d'un réseau de collaborateurs/partenaires,
- Montage et gestion administrative et financière de projets,
- Déploiement de la norme NF EN ISO 15189 au laboratoire,
- Conseillère en radioprotection,
- Encadrement et management.

Ce mémoire est assez dense, de manière à rendre sa lecture plus didactique, des symboles ont été utilisés :



Retour d'expérience et orientations professionnels et/ou personnels sur l'activité conduite

Surveillance et expertise en santé publique

Depuis le début de mon parcours j'ai souhaité m'intéresser uniquement à des activités de recherches visant à améliorer la santé des populations au plus près de leur lieu de vie et de leur problématique.

Depuis mon Doctorat, je travaille au sein d'un Centre National de Référence (CNR). Ces CNR désignés par Santé Publique France (SPF) ont pour mandat d'apporter aux autorités sanitaires une expertise diagnostique, des données de surveillance, des conseils mais aussi de les alerter en cas de phénomènes anormaux. Dans les pages précédentes, je vous ai présenté les différents projets collaboratifs que j'ai pu conduire pour répondre à ces missions. Les évaluations annuelles de SPF me laissent penser que le travail a été et est correctement mené puisque d'un CNR chimiorésistance du paludisme qui était classé C sur une échelle de A à C en 2007, nous sommes depuis 2009 notés A. Pour la période 2012-2016, nous avons eu la lourde tâche de nous regrouper avec le CNR métropolitain traitant de la même thématique. Ainsi, depuis cette date, quatre laboratoires composent le CNR paludisme. A l'occasion de ce regroupement, j'ai été pour la première fois confrontée à la négociation budgétaire et à la nécessité de négocier au mieux notre place, dans l'intérêt du laboratoire et de notre territoire. Au dernier renouvellement, période 2017-2021, le travail fourni m'a permis d'être nommée co-coordinatrice du CNR et d'obtenir une augmentation de 20% de la dotation dédiée à notre laboratoire. Nous sommes aujourd'hui CNR du paludisme pour les zones endémiques françaises.

Dans le cadre de la surveillance du paludisme en Guyane, plusieurs techniques sont mises en œuvre :

- tests de chimiosensibilité *in vitro* vis-à-vis de 11 molécules sur les prélèvements de *P. falciparum*,
- tests de survie vis-à-vis de la dihydro-artémisinine et de la pipéraquline,
- génotypages de gènes de résistance d'intérêt (*pfcytb*, *pfK13*, *pfcr1*, *pfpm2*...)....

Par ailleurs, nous adaptions systématiquement à la multiplication *in vitro* et avec succès l'ensemble, les isolats de *P. falciparum* reçus au laboratoire. Ceci représente un atout important dans le développement de nos programmes de recherche et le montage de nos collaborations. Nous gérons de manière rigoureuse une collection de près de 15 000 plasmas, 775 isolats cryoconservés dans 3 249 cryostabilisats, plus 10 000 extraits d'ADN, des plasmas....

Cette expertise reconnue au niveau national l'a ensuite été au niveau international avec la nomination en 2014 de notre laboratoire comme Centre Collaborateur de l'OMS (CC OMS) pour la surveillance des résistances aux antipaludiques. Cette désignation a été renouvelée en 2018 pour quatre ans. A ce titre, j'interviens pour l'OMS dans la surveillance des résistances et de la pertinence des outils de diagnostic en Amazonie.

Ces activités de santé publique incluent une large part de conseils aux autorités sanitaires tant au niveau régional (suivi du plan de contrôle du paludisme, carte de risque, réponse en cas d'épidémie...), nationales (recommandations de prise en charge, groupes de travail HCSP...) que sur le plan international (réunion transfrontalières, revue de note conceptuelle, élaboration du plan stratégique mondial de l'OMS...).



Ces activités d'expertise en santé publique ont été très formatrices et m'ont imposées de prendre du recul, d'appréhender les difficultés et les limites auxquelles chacun fait face. Ainsi, j'essaie toujours d'analyser et de synthétiser au maximum toutes les informations exposées ou connues et de proposer des solutions, plausibles, et réglementairement acceptables par tous les acteurs en tenant compte de leurs priorités et leurs exigences nationales. Mon objectif est toujours de faire le lien et d'établir un pont entre les activités de recherche que nous conduisons et les décideurs de santé publique que nous cherchons à éclairer. Ceci est très régulièrement affiché par les chercheurs pour obtenir des financements en particulier, mais la mise en pratique est loin d'être évidente et effective. En effet, les temporalités, les contraintes et les priorités de chacun diffèrent. Il me paraît pourtant fondamental, dans la lutte contre une pathologie, que ces deux mondes se rencontrent et se comprennent. Publier des résultats conjointement avec les programmes nationaux et permettre à ces derniers de se les approprier pour qu'ils soient intégrés dans les plans de gestion n'est pas toujours chose facile. Ceci oblige à trouver un consensus, le juste positionnement, le bon message qui permettra à l'information d'être comprise, mesurée, acceptée, et prise en compte pour mieux lutter contre la maladie.

Construction et animation d'un réseau de collaborateurs/partenaires

Les activités de santé publique peuvent difficilement se réaliser sans un réseau de partenaires large et efficace.

Au niveau local, à mon arrivée en 2007 en Guyane, je me suis attachée à renforcer la collecte des échantillons impaludés. A force de missions de sensibilisation et de contacts étroits avec les partenaires de terrain (CDPS, LBM, Hôpitaux), le recrutement s'est amélioré et a atteint depuis quelques années le palier de 75% (y compris en période d'augmentation de la transmission, Figure 25).

L'animation de ce réseau s'effectue par le biais :

- de sensibilisations périodiques sur site qui sont l'occasion pour moi de faire le point sur le paludisme en Guyane et l'actualité des résistances dans la région, les activités et missions du CNR et surtout les modalités de participation du partenaire visité,
- un accueil semestriel des nouveaux internes de l'Hôpital de Cayenne au sein du laboratoire pour une visite/sensibilisation,
- un bulletin annuel de rétro-information largement diffusé et ayant pour objectif : i) d'évaluer la participation de chaque partenaire afin de mieux cibler les actions de sensibilisation à mener, ii) d'informer sur l'état des résistances en Guyane et, iii) de faire un point sur les projets en cours et les derniers résultats obtenus.



Ce travail de fond est invisible et souvent peu considéré, mais prend un temps considérable. Cependant, il fait pour moi partie du travail de base du laboratoire permettant d'obtenir des résultats robustes sur lesquels on s'appuie pour déployer des projets de recherche pertinents et représentatifs.

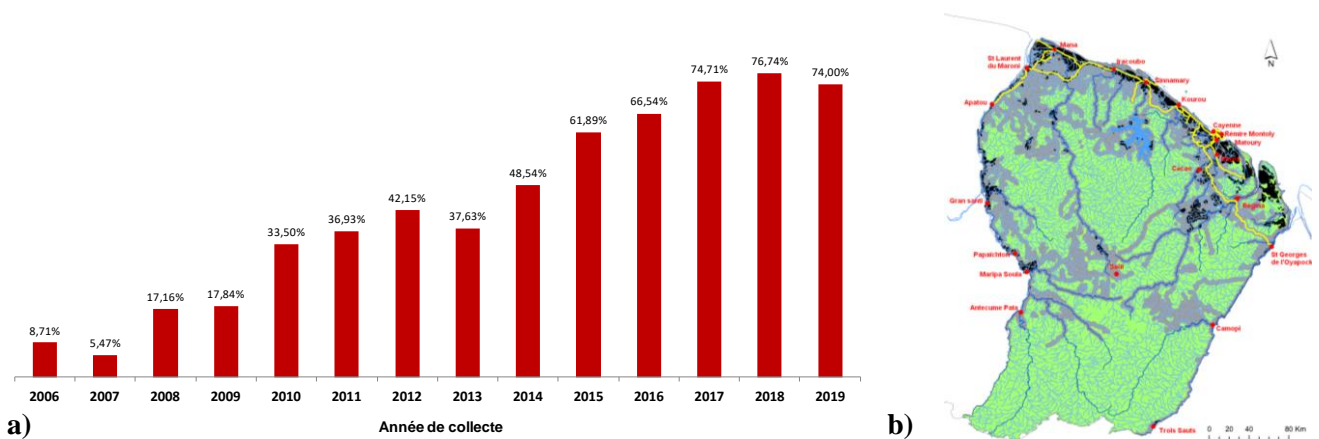


Figure 25. Exhaustivité du recrutement du CNR paludisme (a) et son réseau de partenaires guyanais (b).

Sur la carte figure en rouge les localités où sont situés les partenaires guyanais du CNR paludisme, en jaune le réseau routier, en vert la forêt primaire, en gris les zones forestières impactées par les activités humaines, en noir l'absence de forêt (savane ; marécage ; zones urbaine, d'orpaillage étendu, agricole....).

Au-delà des partenaires du diagnostic, les partenaires de la surveillance et de la gestion sont majeurs. En Guyane, ces derniers sont représentés par la cellule inter-régionale d'épidémiologie et l'Agence Régionale de Santé de Guyane avec qui nous travaillons en étroite collaboration. A cela s'ajoute la Collectivité Territoriale de Guyane qui est en charge de l'éducation de la population à la prévention du paludisme ou encore de la lutte anti-vectorielle sur le territoire.

Au niveau international, nous collaborons maintenant avec les programmes nationaux de lutte contre le paludisme des pays voisins tel que ceux du Guyana, du Suriname, du Brésil et du Venezuela. Les échanges sont aussi permanents avec l'Organisation Panaméricaine de la Santé, notre référent régional, et le programme global de lutte contre le paludisme de l'OMS à Genève, notre référent administratif et technique.



Au XXI^{ème} siècle, plus de recherche sans collaboration !

En effet, les résultats demandés pour publier sont de plus en plus importants et les projets de plus en plus compétitifs. Par ailleurs, le laboratoire reste malgré tout une petite structure qui ne maîtrise pas toutes les techniques requises pour répondre aux questions posées. Bien que l'idéal serait que les collaborations soient une affaire d'institution et d'intérêt commun pour une zone, il s'avère que les collaborations entre chercheurs sont avant tout une aventure humaine avec des personnalités qui s'associent pour répondre à une problématique commune.

Ainsi, ces dernières années, j'ai construit un réseau de collaborateurs autour du laboratoire guidée par quatre grands principes :

- Rechercher la complémentarité,
- Respecter le partenaire et l'éthique de la recherche,
- Veiller à l'intérêt prioritaire du laboratoire mais à l'équilibre de la collaboration,
- Consolider les collaborations sur le long terme.

En Guyane, nous travaillons en très étroite collaboration avec les équipes de l'Hôpital de Cayenne (Figure 26) : le laboratoire de parasitologie-mycologie (sur le volet diagnostic), l'unité des maladies infectieuses et tropicales (sur le volet clinique et prise en charge), la coordination des CDPS (sur le volet terrain et prise en charge en milieu isolé), ou encore le centre d'investigation clinique (sur le volet investigation de terrain). Nous travaillons également avec le service de santé des armées en Guyane. Ce travail conjoint réalisé en bonne intelligence et en toute complémentarité permet à notre petit territoire sous doté en personnels de santé et scientifiques d'obtenir des résultats considérables en proportion des moyens déployés.



Figure 26. Cartographie des collaborateurs du laboratoire de parasitologie en Guyane et à l'international.

En Guyane, les points noirs et carrés gris représentent les lieux où sont situés les centres de diagnostic et de traitement du paludisme qui font partis de notre réseau de collaborateurs. Au niveau mondial, les points roses localisent les villes où sont situés les partenaires avec qui nous collaborons de manière effective. Les logos précisent les institutions concernées.

Au niveau national, nos trois partenaires du CNR permettent un travail conjoint et efficace. Ils incluent les deux laboratoires de parasitologie-mycologie de l'Hôpital Bichat-Claude Bernard et de la Pitié Salpêtrière et l'unité de parasitologie et entomologie, UMR 7278, de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées. Les équipes de l'Institut Pasteur à Paris nous apportent quant à elles des capacités techniques et des compétences relatives aux études sérologiques.

Au niveau international, ce réseau s'étend aujourd'hui en grande majorité aux territoires des Amériques. Nos partenaires nord-américains nous apportent un soutien technique non négligeable sur les aspects de séquençage et d'analyse de données de génomes entiers ou encore de modification génétique parasitaire.

Par ailleurs, au-delà de ce réseau actif, après 20 ans de travail dans le domaine du paludisme et de nombreuses participations à des congrès internationaux, j'ai pu me construire un réseau professionnel large et de qualité qui est aujourd'hui un atout lorsqu'une question de recherche se pose et que nous avons besoin de partenaires pour y répondre.

Administration de la recherche

L'administration de la recherche inclut les montages et le suivi des projets et la gestion des financements associés. Elle prend aujourd'hui une part de plus en plus importante dans la vie d'une chercheuse.

C'est en 2009 que j'ai pu obtenir mon premier et modeste soutien financier en collaboration avec notre partenaire de Marseille. Au fil du temps, mes prérogatives se sont élargies, notamment en 2012 quand j'ai pris la responsabilité du CNR paludisme et de sa dotation de l'Institut National de Veille Sanitaire à l'époque d'une valeur annuelle de 185 000€, 215 000€ depuis 2017 (Figure 27). Au-delà des dotations « santé publique », j'ai commencé à demander régulièrement des financements pour des projets de recherche. Les fonds dédiés disponibles pour réaliser ma recherche dépassent, depuis 2017, les 100 000€ par an. L'objectif est de poursuivre dans ce sens avec le soutien de mon institution malgré sa trésorerie limitée. En effet, les avances sur financement sont réduites pour certains financements tels que les FEDER, ce qui impose à l'institution d'avancer les fonds et de disposer d'une trésorerie suffisante.

Mes premières compétences en comptabilité ont été acquises au cours de mes études pharmaceutiques. Ensuite, elles se sont enrichies *via* la copropriété que je gère et qui nécessite une comptabilité en partie double, ou encore mon implication dans des bureaux d'associations sportives. Je suis ainsi plutôt familière des catégories comptables et de l'analyse des bilans. Je trouve une certaine satisfaction à suivre et gérer financièrement mes projets de manière à les dimensionner au mieux et à les réaliser dans les limites de leur budget. Ainsi, la construction du budget prévisionnel du laboratoire m'intéresse car elle permet de formaliser et décliner financièrement la vision que j'ai du laboratoire et de ses activités pour l'année à venir.

Par ailleurs, les contraintes réglementaires sont de plus en plus présentes, fastidieuses et nécessitent des connaissances légales approfondies qu'il est difficile de maîtriser totalement pour un chercheur sans l'appui des fonctions supports. Ainsi, les services support à la recherche jouent un rôle majeur aujourd'hui, d'appui aux demandes éthiques, d'appui aux demandes réglementaires. Avec toutes ces contraintes, la recherche coûte de plus en plus chère et l'argent dédié à la science en elle-même proportionnellement se réduit.

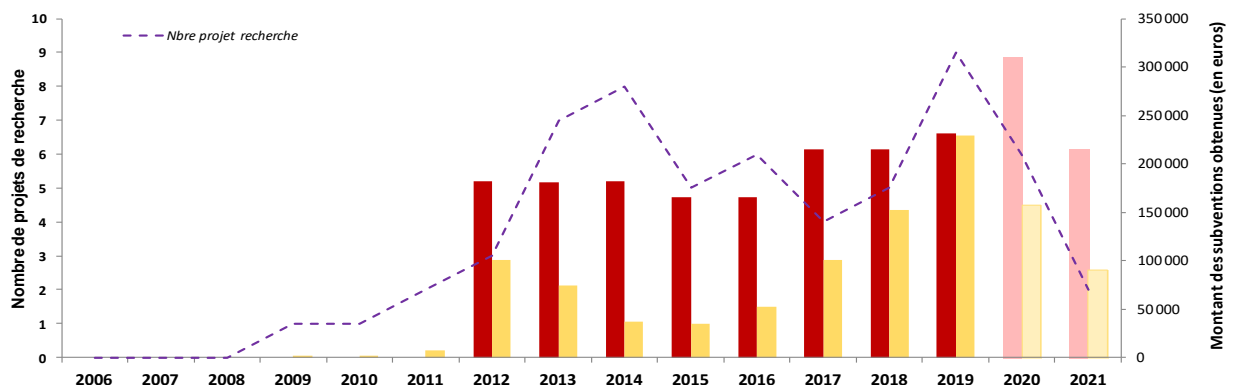


Figure 27. Nombre de projets annuels et montants associés (hors subvention MESR).

Les histogrammes représentent le montant des fonds dédiés à la santé publique (en rouge) et à la recherche (en jaune). MESR : Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche. Seul un prévisionnel est présenté pour 2020 et 2021.



De mon expérience professionnelle, il ressort que je passe environ 60 à 70% de mon temps à rédiger, relire, construire des documents administratifs de synthèse, gérer le laboratoire et ses approvisionnements, animer le réseau de partenaires, rédiger des rapports en tout genre (ou mémoire en vue de soutenance d'HDR !). Ainsi, je dédie environ 30% uniquement à mon cœur de métier : suivre l'actualité scientifique, réfléchir à de nouvelles questions de recherche, orienter les manipulations en cours, etc... Je compare souvent un chercheur à un chef d'entreprise qui doit chercher des fonds pour disposer de ressources humaines et de moyens dédiés à sa recherche mais sans l'autonomie associée. Ainsi, le chercheur dépend de son institution et il est fondamental pour construire des projets encore plus importants que cette dernière soit structurée, solide financièrement et pilotée par des dirigeants faisant confiance et qui permettent d'aller de l'avant.

Déploiement de la norme NF EN ISO 15189 au laboratoire

Entre 2007 et 2011, mon travail s'est principalement axé sur le renforcement de la qualité au laboratoire et notamment sur le contrôle qualité des tests de chimiosensibilité *in vitro*. Je suis partie du principe que les valeurs de chimiosensibilité représentent la pierre angulaire de notre activité. En effet, utilisées en santé publique, elles sont capitales et participent à l'élaboration des recommandations de prise en charge des patients atteints du paludisme. Dans le domaine de la recherche sur les mécanismes de résistance, elles caractérisent phénotypiquement un isolat qui fera par la suite l'objet de nombreuses expérimentations. Par conséquent, la qualité des tests se devait d'être irréprochable et maîtrisée.


Fin 2012, il a été acté par la Direction Générale de la Santé que les laboratoires de référence et d'expertise dont nous faisons partie, rendaient des résultats nominatifs, étaient considérés comme des laboratoires de biologie médicale (lettre DGS du 23 mars 2012). Ainsi, nous devons répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 (ordonnance du 13 janvier 2010, loi du 30 mai 2013 relatives à la biologie médicale). De par mon implication et ma responsabilité vis-à-vis du CNR, j'ai été désignée correspondante qualité de notre laboratoire de 2012 à 2015, date à laquelle je suis devenue, et suis toujours, suppléante de cette fonction.


A l'origine, cette démarche a été conduite avec l'appui du service qualité, environnement et développement durable de l'Institut Pasteur à Paris et grâce au suivi personnalisé de la société PREISO. Un membre de cette société était en charge de nous accompagner dans cette démarche. L'accréditation de notre site a ensuite été obtenue en août 2017.


Une technique entre dans le champ de cette accréditation, le diagnostic différentiel d'espèce plasmodiale par PCR en temps réel. Cette technique a été mise au point au sein du laboratoire. Elle permettait le diagnostic de quatre espèces au sein de deux multiplex. Nous sommes en train de valider la méthode à partir d'une matrice buvard et en y incluant la détection de *P. knowlesi*. Elle inclut donc six paramètres en comptant la détection du gène la macroglobuline comme témoin positif d'extraction. Cette méthode passe avec succès des contrôles externes de la qualité depuis 2014 et a été une des meilleures méthodes lors de l'essai inter-laboratoire que nous avons réalisé au sein du CNR. En effet, elle consomme peu d'ADN, est sensible et spécifique. Il est envisagé de publier cette méthode fin 2020 début 2021.


Notre système de management de la qualité inclut un outil logiciel, Kalilab[®], dont je suis administratrice au laboratoire et qu'il a fallu déployer et paramétrer. A ce jour, nous gérons grâce à ce logiciel nos documents, nos équipements, nos fiches qualités et nos habilitations.

La tâche la plus fastidieuse a été de mettre en place les premières versions des documents, et encore davantage quand il s'agissait des documents généraux visant à harmoniser les pratiques entre les différents laboratoires. Cela nous a obligé à repenser nos modes de fonctionnements et les harmoniser au niveau de l'Institut. A notre échelle, ceci nous a permis d'optimiser les pratiques et d'augmenter le niveau de traçabilité des activités. Cette démarche a été très difficile les premières années mais nous permet aujourd'hui de disposer d'un système abouti au sein duquel le personnel du laboratoire se retrouve, et trouve avantage, même les plus réticents. Ce mode de fonctionnement s'étend à l'ensemble de nos activités de recherche même si toutes nos techniques ne font pas l'objet d'une validation de méthode.

 Au cours de cette démarche, j'ai été amenée à donner beaucoup de ma personne et initier énormément de choses de mon propre chef pour, qu'au fur et à mesure, je puisse convaincre, obtenir l'adhésion et enfin emmener l'équipe avec moi. Je me suis toujours appliquée à ne « faire de la qualité » que dans l'objectif d'améliorer nos pratiques/résultats avant tout et non pour répondre aux auditeurs. Après quatre ans d'un tel fonctionnement, je constate que l'équipe y adhère et aurait aujourd'hui beaucoup de difficultés à fonctionner autrement car, avec le temps, tout le monde est convaincu de sa pertinence malgré le haut niveau d'investissement demandé.

 **2009.** Les débuts du système documentaire ont été mis en place en collaboration avec une étudiante en deuxième année d'école d'ingénieur de biologie industrielle, secteur qualité.

 **2015.** Son déploiement total a été finalisé avec l'appui d'une technicienne qualité dédiée.

 **2017-2020.** La validation de méthode a été réalisée avec l'aide d'une ingénieure de recherche, Y. Lazrek. Elle devrait être publiée et valorisée au dernier trimestre 2020.

Conseillère en radioprotection

La réalisation des tests de chimiosensibilité isotopiques nécessite l'utilisation d'hypoxanthine tritiée. Cette manipulation/détention de radioéléments requière la présence d'une personne compétente en radioprotection (PCR) qui gère :

- Les demandes d'autorisation auprès de l'Agence de Sécurité Nucléaire (ASN),
- Le zonage des locaux de manipulation,
- L'approvisionnement en source radioactives.
- Le suivi des manipulateurs,
- Les déchets (stockage, évacuation, reprise par l'ANDRA),
- Les contrôles réglementaires,
- Les audits internes et externes.

Pour assurer cette fonction, il est nécessaire d'avoir suivi une formation initiale d'une quinzaine de jours, généralement au CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives). Les compétences sont ensuite mises à jour tous les cinq ans par le biais de renouvellement de formation d'une durée de cinq jours. De 2010 à 2015, j'ai été suppléante de cette fonction. Depuis 2015, j'en ai la charge administrative, épaulée par une autre PCR pour les aspects techniques.

A cette date, j'ai procédé à une remise à plat de l'ensemble de l'organisation de ces activités et des procédures associées. Un manuel dit « didactique » a également été conçu de manière à visualiser en quelques diapositives, le système mis en place ainsi que l'ensemble des activités et documents qui s'y rattachent. L'ensemble de ces documents est référencé dans le système documentaire global du laboratoire.



Les actions autour de la radioprotection ont été similaires à celles de la démarche qualité NF EN ISO 15189. Très chronophages au départ, le temps de remettre à plat le système, elles ont ensuite permis d'aboutir à un fonctionnement optimisé, fluide au quotidien. Cela nous fait aujourd'hui gagner beaucoup de temps et nous permet surtout de respecter l'ensemble des obligations sans difficulté. Le fonctionnement choisi a d'ailleurs été reconnu et validé par l'ASN lors de son audit de mars 2015.

Encadrement d’équipe et management

Je suis responsable d’un laboratoire comptant 5 à 9 personnes depuis cinq ans. Dans ce cadre, je définis la stratégie scientifique et les orientations du laboratoire en veillant à maintenir : i) une cohérence dans les projets développés, ii) une adéquation avec les ressources disponibles et iii) un dynamisme et une implication de l’équipe. L’équipe est petite, je dois donc veiller à choisir les thématiques les plus pertinentes, valorisables, et qui nous permettent d’être compétitifs. Les points forts sur lesquels je m’appuie sont : i) nos connaissances du terrain, ii) l’accès aux échantillons et les collections disponibles, iii) notre réseau de partenaires et, iv) la maîtrise de techniques de pointe en culture cellulaire. Je privilégie la qualité des publications plutôt que le nombre. Mon défi est d’arriver à maintenir l’effectif du laboratoire au dessus des ressources de base nécessaires à son fonctionnement quotidien (surveillance, aspects administratifs et réglementaires notamment), car ce sont ces ressources qui nous permettent d’avancer efficacement côté recherche et de créer une émulation scientifique au sein de l’équipe.

Une fois la stratégie définie, elle est exposée à l’ensemble des acteurs du laboratoire pour qu’ils se l’approprient. Pour ce faire, je présente chaque année un bilan des activités de l’année précédente en lien avec les objectifs qui avaient été fixés et les objectifs de l’année à venir. Je veille tout particulièrement à ce que les activités soient proportionnées aux moyens dédiés et à ce que chacun y trouve épanouissement en fonction des compétences dont il dispose.

D’un point de vue individuel, je réalise un entretien individuel à mi-année, afin de réserver un moment d’échange privilégié avec chacun de mes collaborateurs en dehors des entretiens individuels formels. J’organise également des réunions de service hebdomadaires visant à coordonner les activités, expliquer les choix et les ajustements, écouter les difficultés rencontrées ou les suggestions et à ce que tout le monde soit au même niveau d’information. Elles font toutes l’objet d’un compte-rendu. Cette activité de management me prend environ 10% de mon temps, parfois plus, mais est indispensable à la cohésion de l’équipe.

Au cours de ces vingt années de recherche, j’ai accompagné 33 étudiants de différents niveaux (Figure 28). La moitié avait un niveau master ou plus et incluait deux thèses d’exercice et une thèse de science en co-direction. Cette contribution à la formation des plus jeunes est pour moi une composante fondamentale de l’activité d’un chercheur. Un scientifique doit pouvoir transmettre son savoir et son savoir-faire, initier les plus jeunes à une culture scientifique et une approche méthodologique rigoureuse basée sur un esprit critique et rationnel qui s’enrichit de l’expérience de la communauté, au sens large, qui nous entoure. Trois personnes ont beaucoup compté au cours de mon parcours, M. Le Bras, mon directeur de thèse, M. Fidock, mon partenaire scientifique depuis mon post-doctorat et M. Spiegel, paludologue de terrain, directeur de 2007 à 2012 de l’Institut Pasteur de la Guyane. Ainsi, au cours de mes encadrements, j’essaie de transmettre ce qu’ils m’ont eux-mêmes transmis : probité, respect, confiance, rigueur, engagement, bienveillance, sincérité et goût du travail bien fait. Le monde de la recherche est un monde rude, de plus en plus compétitif, au sein duquel il est important de rester fidèle à ses valeurs et ce pourquoi on fait les choses.

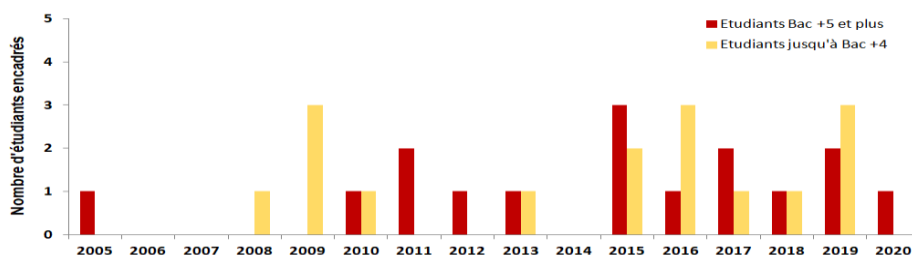


Figure 28. Nombre d’étudiants encadrés par an et par niveau de formation. Les encadrements sur plusieurs années (ex : thèse, postdoc) ne figurent qu’une fois l’année d’arrivée au laboratoire.



Au fil du temps et des expériences, j’ai appris à davantage observer les compétences et les capacités de chacun afin d’adapter mes attentes. Chaque individu est différent avec ses forces et ses faiblesses et il est important d’en tenir compte pour obtenir le meilleur de chacun. Par ailleurs, au fil du temps, j’ai aussi davantage structuré une période de stage en entrant moins rapidement dans les manipulations et en imposant à l’étudiant de commencer par présenter le sujet dont il a la charge. Cet exercice permet d’évaluer efficacement les capacités de compréhension et de synthèse d’un individu et là encore, de s’adapter.

Mise en perspective de mon parcours

Engagement, Rigueur, Pragmatisme, et Constance

Vous avez pu au cours de ce document apprécier le travail que j'ai pu accomplir en tant que chercheuse au cours de ces vingt dernières années et la contribution que j'ai pu apporter aux enjeux des thématiques que j'étudie et des questions de santé publique associées. J'ai suivi un parcours que j'estime cohérent et acquis une formation complète qui a débutée en étudiant le paludisme d'importation des voyageurs parisiens de retour d'Afrique de l'Ouest, et se déroule aujourd'hui en zone d'endémie sud-américaine. Tout cela en passant par un laboratoire universitaire de grande qualité au cours de mon postdoctorat qui m'a permis d'élargir mon panel de techniques maîtrisées. Ainsi, j'aborde la recherche en santé publique comme un concept global qui se veut pluridisciplinaire, transversal et translationnel, allant du malade au laboratoire en passant par les lieux de prise en charge en zone de transmission. Dans le monde de la recherche actuel, compétitif et exigeant, je me suis toujours attachée à mener à bien mes projets avec rigueur et pugnacité en toute complémentarité avec mes partenaires et en privilégiant toujours la qualité à la quantité. Ainsi, cela m'a permis d'être aujourd'hui à l'origine ou associée à cinquante publications dont cinq revues, et mes perspectives en termes de recherche sont nombreuses, présentées au fil de ce document.

Au delà de ces aspects recherche, ma formation initiale de pharmacienne ne m'a jamais quittée. Elle m'a apporté la rigueur nécessaire et le sens des responsabilités vis-à-vis des patients mais aussi aujourd'hui, envers les étudiants et personnels que j'encadre au quotidien. Mon engagement a toujours eu vocation à répondre aux enjeux de la prise en charge et du diagnostic des malades atteints de paludisme et à apporter un éclairage scientifique, ainsi que des données fiables aux décideurs de santé publique. Le serment de Galien que j'ai prêté mi-2002 m'anime depuis le début, « *Exercer dans l'intérêt de la santé publique,.....ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.* » Travailler toujours dans l'intérêt des malades et des habitants d'une zone à risque me motive et m'anime. J'exerce depuis 12 ans en Guyane, zone d'endémie certes, mais pays de mon enfance, carrefour de tant de cultures, de spécificités et d'opportunités. Territoire riche de 300 000 habitants représentatifs d'une grande partie des cultures de cette planète et territoire d'une sous-région incluant de nombreux pays, petits ou grands, si différents mais partageant un environnement similaire et des populations communes. Ce qui me motive c'est respecter au maximum ces individus, comprendre leur mode de fonctionnement et les limitations qu'ils rencontrent face à la maladie, faire entendre nos spécificités et nos problématiques tellement différentes de celles de la France hexagonale pour déployer collectivement des approches adaptées, pragmatiques et innovantes. C'est forte de mon expertise que je tente en permanence de faire le lien entre le monde de la recherche et le monde des décideurs en santé publique locaux, nationaux ou internationaux. Vulgariser les données scientifiques et leurs implications pour que les décideurs y adhèrent et les prennent en compte pour faire évoluer les programmes de lutte contre la maladie. Faire aussi le lien entre le temps long des décisions/concertations publiques, de la recherche et des démarches administratives associées et le temps court, d'un besoin immédiat d'une meilleure prise en charge des patients.

En tant que professionnel de santé, j'exerce aujourd'hui un métier multi facettes : pharmacienne, chercheuse, biologiste médicale et enseignante. Depuis mai 2019, j'ai également des responsabilités de conseillère à l'ordre des pharmaciens. Mes journées sont riches, toutes différentes et intéressantes. De nature dynamique, curieuse, motivée et sincère, mes mentors m'ont également transmis avec bienveillance des valeurs de probité, de rigueur et d'impartialité qui animent aujourd'hui la pharmacienne-chercheuse-biologiste que je suis. Je transmets à mon tour ces valeurs et les connaissances dont je dispose aux étudiants que j'encadre. Obtenir cette habilitation à diriger des recherches serait pour moi la reconnaissance par mes pairs, de mon parcours et de mes compétences. Cela représente aussi pour moi la possibilité d'évoluer vers des projets de plus grande envergure avec mes partenaires et avec la confiance et le soutien de mes institutions.

Bibliographie

- Alavi, Y., M. Arai, J. Mendoza, M. Tufet-Bayona, R. Sinha, K. Fowler, O. Billker, B. Franke-Fayard, C. J. Janse, A. Waters and R. E. Sinden (2003). "The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: a study of the infectivity of Plasmodium berghei and Plasmodium gallinaceum, and their transmission by Anopheles stephensi, Anopheles gambiae and Aedes aegypti." *Int J Parasitol* **33**(9): 933-943.
- Anderson, T. J. and C. Roper (2005). "The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers." *Acta Trop* **94**(3): 269-280.
- Ariey, F., B. Witkowski, C. Amaratunga, J. Beghain, A. C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Menard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J. C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon and D. Menard (2014). "A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria." *Nature* **505**(7481): 50-55.
- Awasthi, G. and A. Das (2013). "Genetics of chloroquine-resistant malaria: a haplotypic view." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108**(8): 947-961.
- Barry, A. E., A. Waltmann, C. Koepfli, C. Barnadas and I. Mueller (2015). "Uncovering the transmission dynamics of Plasmodium vivax using population genetics." *Pathog Glob Health* **109**(3): 142-152.
- Basco, L. K. and P. Ringwald (2001). "Analysis of the key pfcr1 point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon." *J Infect Dis* **183**(12): 1828-1831.
- Blasco, B., D. Leroy and D. A. Fidock (2017). "Antimalarial drug resistance: linking Plasmodium falciparum parasite biology to the clinic." *Nat Med* **23**(8): 917-928.
- Chen, N., D. E. Kyle, C. Pasay, E. V. Fowler, J. Baker, J. M. Peters and Q. Cheng (2003). "pfcr1 Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant Plasmodium falciparum isolates from the Philippines." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(11): 3500-3505.
- Chenet, S. M., S. Akinyi Okoth, C. S. Huber, J. Chandrabose, N. W. Lucchi, E. Talundzic, K. Krishnalall, N. Ceron, L. Musset, A. Macedo de Oliveira, M. Venkatesan, R. Rahman, J. W. Barnwell and V. Udhayakumar (2016). "Independent Emergence of the Plasmodium falciparum Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana." *J Infect Dis* **213**(9): 1472-1475.
- Cortese, J. F., A. Caraballo, C. E. Contreras and C. V. Plowe (2002). "Origin and dissemination of Plasmodium falciparum drug-resistance mutations in South America." *J Infect Dis* **186**(7): 999-1006.
- de Santana Filho, F. S., A. R. Arcanjo, Y. M. Chehuan, M. R. Costa, F. E. Martinez-Espinosa, J. L. Vieira, M. G. Barbosa, W. D. Alecrim and M. G. Alecrim (2007). "Chloroquine-resistant Plasmodium vivax, Brazilian Amazon." *Emerg Infect Dis* **13**(7): 1125-1126.
- Dipanjan, B., G. Shivaprakash and O. Balaji (2017). "Triple Combination Therapy and Drug Cycling-Tangential Strategies for Countering Artemisinin Resistance." *Curr Infect Dis Rep* **19**(7): 25.
- Durrand, V., A. Berry, R. Sem, P. Glaziou, J. Beaudou and T. Fandeur (2004). "Variations in the sequence and expression of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (Pfcr1) and their relationship to chloroquine resistance in vitro." *Mol Biochem Parasitol* **136**(2): 273-285.
- Ecker, A., A. M. Lehane, J. Clain and D. A. Fidock (2012). "PfCRT and its role in antimalarial drug resistance." *Trends Parasitol*.
- Fidock, D. A., T. Nomura, A. K. Talley, R. A. Cooper, S. M. Dzekunov, M. T. Ferdig, L. M. Ursos, A. B. Sidhu, B. Naude, K. W. Deitsch, X. Z. Su, J. C. Wootton, P. D. Roepe and T. E. Wellems (2000). "Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance." *Mol Cell* **6**(4): 861-871.
- Gamboa, D., M. F. Ho, J. Bendezu, K. Torres, P. L. Chiodini, J. W. Barnwell, S. Incardona, M. Perkins, D. Bell, J. McCarthy and Q. Cheng (2010). "A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfrp2 and pfrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests." *PLoS ONE* **5**(1): e8091.
- Henry, N. B., S. S. Serme, G. Siciliano, S. Sombie, A. Diarra, N. Sagnon, A. S. Traore, S. B. Sirima, I. Soulama and P. Alano (2019). "Biology of Plasmodium falciparum gametocyte sex ratio and implications in malaria parasite transmission." *Malar J* **18**(1): 70.
- Joy, D. A., X. Feng, J. Mu, T. Furuya, K. Chotivanich, A. U. Krettli, M. Ho, A. Wang, N. J. White, E. Suh, P. Beerli and X. Z. Su (2003). "Early origin and recent expansion of Plasmodium falciparum." *Science* **300**(5617): 318-321.
- Kahn, S. M., W. Jiang, T. A. Culbertson, I. B. Weinstein, G. M. Williams, N. Tomita and Z. Ronai (1991). "Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification." *Oncogene* **6**(6): 1079-1083.
- Kim, J., Y. Z. Tan, K. J. Wicht, S. K. Erramilli, S. K. Dhingra, J. Okombo, J. Vendome, L. M. Hagenah, S. I. Giacometti, A. L. Warren, K. Nosol, P. D. Roepe, C. S. Potter, B. Carragher, A. A. Kossiakoff, M. Quick, D. A. Fidock and F. Mancia (2019). "Structure and drug resistance of the Plasmodium falciparum transporter PfCRT." *Nature* **576**(7786): 315-320.
- Le Bras, J. and P. Deloron (1983). "In vitro study of drug sensitivity of Plasmodium falciparum: evaluation of a new semi-micro test." *Am J Trop Med Hyg* **32**(3): 447-451.
- Marques, M. M., M. R. Costa, F. S. Santana Filho, J. L. Vieira, M. T. Nascimento, L. W. Brasil, F. Nogueira, H. Silveira, R. C. Reyes-Lecca, W. M. Monteiro, M. V. Lacerda and M. G. Alecrim (2014). "Plasmodium vivax chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon." *Antimicrob Agents Chemother* **58**(1): 342-347.
- Nair, S., X. Li, G. A. Arya, M. McDew-White, M. Ferrari, F. Nosten and T. J. C. Anderson (2018). "Fitness Costs and the Rapid Spread of kelch13-C580Y Substitutions Conferring Artemisinin Resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **62**(9).
- Nair, S., D. Nash, D. Sudimack, A. Jaidee, M. Barends, A. C. Uhlemann, S. Krishna, F. Nosten and T. J. Anderson (2007). "Recurrent Gene Amplification and Soft Selective Sweeps during Evolution of Multidrug Resistance in Malaria Parasites." *Mol Biol Evol* **24**(2): 562-573.

- Nkrumah, L. J., R. A. Muhle, P. A. Moura, P. Ghosh, G. F. Hatfull, W. R. Jacobs, Jr. and D. A. Fidock (2006). "Efficient site-specific integration in *Plasmodium falciparum* chromosomes mediated by mycobacteriophage Bxb1 integrase." Nat Methods **3**(8): 615-621.
- Noedl, H., Y. Se, K. Schaefer, B. L. Smith, D. Socheat and M. M. Fukuda (2008). "Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia." N Engl J Med.
- Okombo, J., E. Ohuma, S. Picot and A. Nzila (2011). "Update on genetic markers of quinine resistance in *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol.
- Orjuela-Sanchez, P., M. C. Brandi and M. U. Ferreira (2013). "Microsatellite analysis of malaria parasites." Methods Mol Biol **1006**: 247-258.
- Payne, D. (1987). "Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*." Parasitol Today **3**(8): 241-246.
- Preiser, P. R., R. J. Wilson, P. W. Moore, S. McCready, M. A. Hajibagheri, K. J. Blight, M. Strath and D. H. Williamson (1996). "Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA." Embo J **15**(3): 684-693.
- Savini, H., H. Bogreau, L. Bertaux, H. Bouchiba, P. Kraemer, D. Parzy, E. Garnotel, C. Rogier, F. Simon and B. Pradines (2008). "First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* during treatment in a traveler in Comoros." Antimicrob Agents Chemother **52**(6): 2283-2284.
- Srivastava, I. K., J. M. Morrisey, E. Darrouzet, F. Daldal and A. B. Vaidya (1999). "Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites." Mol Microbiol **33**(4): 704-711.
- Talman, A. M., J. Clain, R. Duval, R. Menard and F. Ariey (2019). "Artemisinin Bioactivity and Resistance in Malaria Parasites." Trends Parasitol.
- Thomas, S. M., O. Ndir, T. Dieng, S. Mboup, D. Wypij, J. H. Maguire and D. F. Wirth (2002). "In vitro chloroquine susceptibility and PCR analysis of pfcr1 and pfmdr1 polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal." Am J Trop Med Hyg **66**(5): 474-480.
- Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." Science **193**(4254): 673-675.
- Vreden, S. G., J. K. Jitan, R. D. Bansie and M. R. Adhin (2013). "Evidence of an increased incidence of day 3 parasitaemia in Suriname: an indicator of the emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemether." Mem Inst Oswaldo Cruz **108**(8): 968-973.
- White, N. J. (1997). "Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo." Antimicrob Agents Chemother **41**(7): 1413-1422.
- White, N. J. (2004). "Antimalarial drug resistance." J Clin Invest **113**(8): 1084-1092.
- WHO (2018). Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy. W. a. H. Organization. Geneva, World and Health Organization.
- Witkowski, B., C. Amaratunga, N. Khim, S. Sreng, P. Chim, S. Kim, P. Lim, S. Mao, C. Sopha, B. Sam, J. M. Anderson, S. Duong, C. M. Chuor, W. R. Taylor, S. Suon, O. Mercereau-Puijalon, R. M. Fairhurst and D. Menard (2013). "Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies." Lancet Infect Dis **13**(12): 1043-1049.
- Witkowski, B., V. Duru, N. Khim, L. S. Ross, B. Saintpierre, J. Beghain, S. Chy, S. Kim, S. Ke, N. Kloeung, R. Eam, C. Khean, M. Ken, K. Loch, A. Bouillon, A. Domergue, L. Ma, C. Bouchier, R. Leang, R. Huy, G. Nuel, J. C. Barale, E. Legrand, P. Ringwald, D. A. Fidock, O. Mercereau-Puijalon, F. Ariey and D. Menard (2017). "A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study." Lancet Infect Dis **17**(2): 174-183.
- Wootton, J. C., X. Feng, M. T. Ferdig, R. A. Cooper, J. Mu, D. I. Baruch, A. J. Magill and X. Z. Su (2002). "Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*." Nature **418**(6895): 320-323.
- WWARN (2019). "Association of mutations in the *Plasmodium falciparum* Kelch13 gene (Pf3D7_1343700) with parasite clearance rates after artemisinin-based treatments-a WWARN individual patient data meta-analysis." BMC Med **17**(1): 1.
- Xie, S. C., C. Dogovski, E. Hanssen, F. Chiu, T. Yang, M. P. Crespo, C. Stafford, S. Batinovic, S. Teguh, S. Charman, N. Klonis and L. Tilley (2016). "Haemoglobin degradation underpins the sensitivity of early ring stage *Plasmodium falciparum* to artemisinins." J Cell Sci **129**(2): 406-416.

Annexes

J'ai choisi de vous présenter en annexe de ce document
les trois publications qui me tiennent le plus à cœur.

Annexe 1

Musset L, Le Bras J, Clain J. Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol*, **2007**;24(8):1582-5. DOI: [10.1093/molbev/msm087](https://doi.org/10.1093/molbev/msm087). IF n+2: 9.87.

Papier réalisé à la fin de mon doctorat et qui a permis de décrire l'évolution parallèle des mutations pfcytb responsables de la résistance à l'atovaquone-proguanil et qui étaient sélectionnées chez le patient au cours du traitement et non encore transmises par le moustique. Publication réalisée avec Jérôme et M Le Bras.

Annexe 2

Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkmand SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA*, Neafsey DE* & **Musset L**. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: reversal of chloroquine resistance by acquisition of a novel pfcr1 mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2015**;112(37):11672-77. DOI: [10.1073/pnas.1507142112](https://doi.org/10.1073/pnas.1507142112). IF n+2: 9.66.

L'un de mes premiers papiers que je signe en dernier auteur sur un sujet qui a fait le lien entre ma thématique de post-doctorat et celle de mon aventure professionnelle guyanaise. Sujet qui m'a obligé à bien choisir mes collaborations et veiller sans cesse à l'intérêt premier du laboratoire. Là encore, description d'un phénomène adaptatif lié à la résistance aux antipaludiques et qui, au-delà de la chloroquine, nous emmène aujourd'hui sur la compréhension du mécanisme de résistance d'une autre amino-4-quinoléine, la pipéraquline.

Annexe 3

Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Ade MP, Lucchi NW, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Demar M, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, **Musset L**. Local emergence and clonal propagation in eastern Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. *Elife*, **2020**;9:e51015. DOI: [10.7554/eLife.51015](https://doi.org/10.7554/eLife.51015). IF n-1: 7.55.

Papier issu de mon premier encadrement d'une doctorante avec mes collaborateurs de longue date. Toujours associé terrain et manipulations de laboratoire poussées. Peut-être aurait-il été possible de sortir encore un peu plus haut mais mon expérience en termes de rédaction de publication et la notoriété de l'équipe limitent peut être encore un tel aboutissement.

Les suppléments sont accessibles en ligne pour chaque publication.

Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfcr*t

Stéphane Pelleau^a, Eli L. Moss^b, Satish K. Dhingra^c, Béatrice Volney^a, Jessica Casteras^a, Stanislaw J. Gabryszewski^c, Sarah K. Volkman^{d,e,f}, Dyann F. Wirth^{d,e}, Eric Legrand^a, David A. Fidock^{c,g,1}, Daniel E. Neafsey^{b,1}, and Lise Musset^{a,2}

^aLaboratoire de parasitologie, WHO Collaborating Center for Surveillance of Anti-Malarial Drug Resistance, Centre National de Référence du paludisme, Laboratoire associé pour la région Antilles-Guyane, Institut Pasteur de la Guyane, 97300 Cayenne, French Guiana; ^bGenome Sequencing and Analysis Program, Broad Institute, Cambridge, MA 02142; ^cDepartment of Microbiology and Immunology, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY 10032; ^dDepartment of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, MA 02115; ^eInfectious Disease Program, Broad Institute, Cambridge, MA 02142; ^fSchool of Nursing and Health Sciences, Simmons College, Boston, MA 02115; and ^gDivision of Infectious Diseases, Department of Medicine, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY 10032

Edited by Thomas E. Wellems, NIH, Bethesda, MD, and approved July 6, 2015 (received for review April 16, 2015)

In regions with high malaria endemicity, the withdrawal of chloroquine (CQ) as first-line treatment of *Plasmodium falciparum* infections has typically led to the restoration of CQ susceptibility through the reexpansion of the wild-type (WT) allele K76 of the chloroquine resistance transporter gene (*pfcr*t) at the expense of less fit mutant alleles carrying the CQ resistance (CQR) marker K76T. In low-transmission settings, such as South America, drug resistance mutations can attain 100% prevalence, thereby precluding the return of WT parasites after the complete removal of drug pressure. In French Guiana, despite the fixation of the K76T allele, the prevalence of CQR isolates progressively dropped from >90% to <30% during 17 y after CQ withdrawal in 1995. Using a genome-wide association study with CQ-sensitive (CQS) and CQR isolates, we have identified a single mutation in *pfcr*t encoding a C350R substitution that is associated with the restoration of CQ susceptibility. Genome editing of the CQR reference strain 7G8 to incorporate PfCRT C350R caused a complete loss of CQR. A retrospective molecular survey on 580 isolates collected from 1997 to 2012 identified all C350R mutant parasites as being CQS. This mutation emerged in 2002 and rapidly spread throughout the *P. falciparum* population. The C350R allele is also associated with a significant decrease in piperazine susceptibility *in vitro*, suggesting that piperazine pressure in addition to potential fitness costs associated with the 7G8-type CQR *pfcr*t allele may have selected for this mutation. These findings have important implications for understanding the evolutionary dynamics of antimalarial drug resistance.

malaria | drug resistance | evolution | *Plasmodium falciparum* | PfCRT

The emergence of drug-resistant pathogens is a major threat to human health, and *Plasmodium falciparum* has shown its capacity to develop resistance to every drug that has been deployed against it on a large scale. Although Africa carries by far the heaviest burden of malaria, parasite resistance to chloroquine (CQ), sulfadoxine-pyrimethamine (1), and more recently, artemisinins (2) first emerged in southeast Asia and South America (the latter only for CQ and sulfadoxine-pyrimethamine), where transmission intensity is low. This evolving situation underscores the importance of understanding the evolutionary dynamics of antimalarial drug resistance in distinct transmission contexts. In Central or South America, where clonal propagation can occur (3), the population genetic diversity is reduced, with high rates of inbreeding (4). As a consequence, strong drug pressure can ultimately lead to fixation of drug resistance alleles, even if they generate a fitness cost to parasites in the absence of drug pressure. Thus, whereas in high-transmission African settings, changes in drug pressure are known to alter the relative proportions of mutant and WT alleles of drug resistance determinants, less is known about how drug-selective forces operate in low-transmission contexts where resistance alleles are already fixed. Here, we have examined the evolution of

P. falciparum CQ resistance (CQR) in French Guiana after successive changes in therapeutic policy.

French Guiana is a French overseas territory in South America that is included in the Guiana Shield, a pre-Cambrian geological formation including Guyana, Surinam, French Guiana, and parts of Venezuela, Brazil, and Colombia. The region is endemic for both *P. falciparum* and *Plasmodium vivax* (5). In the past 15 y, this population of ~250,000 inhabitants has experienced a greater than 75% decrease in annual cases of malaria: ~4,500 cases in 2000 compared with fewer than 500 cases in 2014. French Guiana is currently in a control phase and on track to soon enter a preelimination phase (fewer than 5% of febrile patients test positive for *Plasmodium*), a situation akin to that in 55 other countries around the world (6). Treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria cases with the former first-line antimalarial CQ was officially abandoned in 1995 because of poor clinical efficacy. Quinine (QN) plus doxycycline became the subsequent treatment of choice until 2007, with sporadic use of halofantrine and mefloquine (MQ). Artemether-lumefantrine, an artemisinin-based combination therapy (ACT), was widely implemented in 2008. Although the artemether-lumefantrine combination has been the official first-line treatment since 2008, illegal gold miners living

Significance

This study addresses the evolutionary dynamics of antimalarial drug resistance after changes in drug use. We show that chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from French Guiana was lost after sustained drug removal, whereas the resistance marker PfCRT K76T remained fixed in the parasite population. This phenotypic reversion was caused by the acquisition of a single additional C350R substitution in PfCRT. This genetic change also impaired susceptibility to piperazine, suggesting that piperazine pressure drove the expansion of this allele. These findings have important implications for understanding drug resistance evolution when standard resistance alleles reach fixation and can lose their utility as markers because of adaptive changes at other amino acid positions or loci in the genome.

Author contributions: S.P., S.K.V., D.A.F., D.E.N., and L.M. designed research; S.P., S.K.D., B.V., J.C., S.J.G., D.F.W., and L.M. performed research; E.L.M. and D.E.N. contributed new reagents/analytic tools; S.P., E.L.M., S.K.D., S.J.G., E.L., D.A.F., D.E.N., and L.M. analyzed data; and S.P., S.J.G., D.A.F., D.E.N., and L.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹D.A.F. and D.E.N. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. Email: lisemusset@gmail.com.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1507142112/-DCSupplemental.

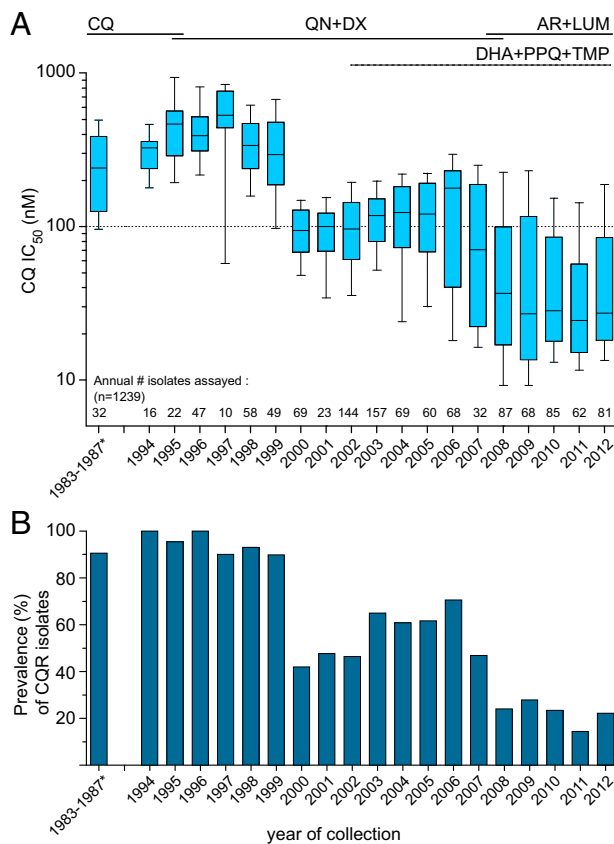


Fig. 1. Evolution of *P. falciparum* in vitro CQ susceptibility in French Guiana from 1983 to 2012. Lines above graphs indicate the successive change in drug recommendations in French Guiana throughout the study period. (A) Box and whisker plots showing the distribution of CQ IC₅₀ values. Whiskers show the 10th and 90th percentiles, boxes represent interquartile range, and the horizontal line is the median. Isolate numbers per year are listed above the x axis. (B) Observed percentage of CQR isolates over time defined by an IC₅₀ > 100 nM. AR, artemether; DX, doxycycline. *1983–1987 data are from ref. 17.

in the forest are known to self-medicate their fevers with dihydroartemisinin (DHA) -piperazine (PPQ) -trimethoprim (TMP; DHA + PPQ + TMP; Artemcom) tablets.

In South America, the prevalence of the CQR marker K76T in the drug efflux transmembrane protein PfCRT has remained high, despite CQ having been abandoned for the treatment of *P. falciparum* infections (7–9). This situation contrasts with multiple settings in Africa, where the majority of molecular studies (10–13) have documented an increase in the prevalence of WT *pfcr*t after CQ withdrawal. An analysis of the diversity of microsatellites flanking *pfcr*t in Malawi showed that the return to CQ susceptibility was caused by a reexpansion of the WT PfCRT haplotype (11). Such a difference between South America and other endemic regions in response to CQ withdrawal is generally attributed to other amino acid changes in PfCRT and PfMDR1 (both present on the parasite digestive vacuole membrane), which accompany the PfCRT K76T substitution. Specifically, the SVMNT haplotype of South American parasites at PfCRT amino acids 72–76 has been found to be less deleterious than the CVIET haplotype present elsewhere (14, 15). Another explanation for the virtual fixation of CQR alleles in South American parasites is that CQ continues to be used to treat *P. vivax* infections and therefore, may exert a residual pressure. Lastly, it is thought that the earlier campaign of adding low-dose amodiaquine (AQ) to table salt proved highly effective at creating a selective sweep of AQ and CQR-conferring mutant *pfcr*t after it had arisen in the late 1950s and eliminating any vestigial WT *pfcr*t.

We have previously reported that a significant proportion of *P. falciparum* parasites from French Guiana have a CQ IC₅₀ below the adopted resistance threshold of 100 nM, despite elevated prevalence of K76T, suggesting a reduced predictive value of this marker, at least in this region of South America (16). In this study, we pursued a genotypic and phenotypic survey, including whole-genome sequencing and gene-editing experiments, which led us to identify a molecular marker of drug susceptibility. These findings have important implications for understanding drug resistance evolution in a low-endemicity context where drug resistance alleles can reach fixation, a scenario that will become increasingly dominant as successful control efforts progressively reduce the burden of malaria.

Results

CQ Susceptibility Has Returned to French Guiana After Drug Withdrawal.

We tested the in vitro CQ susceptibility of 1,207 *P. falciparum* isolates collected between 1994 and 2012 and compared these data with those previously reported for the 1983–1987 period (17). The general trend is that CQ susceptibility followed changes in drug policy (Fig. 1) and can be divided into three main periods. It took 5 y after the official CQ withdrawal in 1995 to observe a decrease in the prevalence of in vitro CQR isolates from ~90% to ~40% (Fig. 1B). Of note, such a high prevalence of CQR at ~90% in the 1990s was already reported in the mid-1980s. From 2000 to 2006, a consistent but small increase in the prevalence of CQR isolates was observed (up to 70% in 2006), potentially because of an overlap between the mechanisms of drug response to CQ and the first-line therapies used at that time (notably QN). This trend toward a resurgence of CQR, however, reversed concomitantly with the progressive introduction of ACT as first-line therapy in 2007. Within 2 y, the prevalence of CQR isolates dropped and thereafter, remained stable at ~25% (2008–2012).

Mutant PfCRT and PfMDR1 Haplotypes Are Fixed in the Parasite Population.

We genotyped a large panel of patient isolates collected between 1997 and 2012 (Table 1). Of 1,054 isolates genotyped for the *pfcr*t gene, the mutant haplotype SVMNT was present in 97.5%, a far greater proportion than the mean percentage of in vitro CQR parasites (48.6%) observed in the same period. Haplotypes other than SVMNT were very rare ($n = 26$ of 1,054). For 18 of these 26 patients for whom we had information, 15 had traveled to West Africa (5 CVIET and 10 CVMNK) and 2 had traveled to Haiti (CVMNK) in the previous month, leaving a single patient harboring a CVMNK haplotype that could have been transmitted locally. A similar allelic fixation could be observed for the *pfmdr*1 gene, because 86.3% of 861 genotyped isolates displayed the South American resistance-associated NFCDY haplotype (amino acids 86, 184, 1,034, 1,042, and 1,246) (Table 1). Altogether, the sum of PfCRT/PfMDR1 haplotypes SVMNT/NFCDY (7G8-type; $n = 688$) and SVMNT/NFSDY ($n = 108$) was present in 99.0% of the

Table 1. Prevalence of PfCRT and PfMDR1 haplotypes of isolates collected in French Guiana (1997–2012)

Haplotype	<i>n</i>	Frequency (%)
PfCRT (<i>n</i> = 1,054)		
SVMNT	1,028	97.5
CVMNK	17	1.6
CVIET	9	0.9
PfMDR1 (<i>n</i> = 861)		
NFCDY	743	86.3
NFSDY	113	13.1
NFCDD	2	0.2
NFSND	2	0.2
NYSND	1	0.1

Haplotypes denote amino acids at positions 72–76 for PfCRT and positions 86, 184, 1,034, 1,042, and 1,246 for PfMDR1.

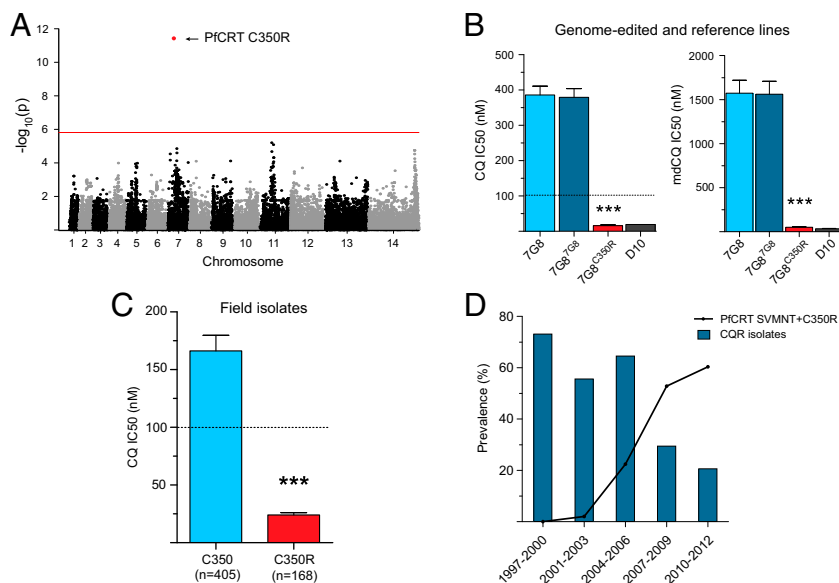


Fig. 2. PfCRT C350R is the determinant of in vitro CQR reversion. (A) Signal of SNPs associated with CQ susceptibility. The Manhattan plot shows P values for SNPs with minor allele frequencies $>10\%$. The horizontal red line indicates the P value significance threshold. After adjusting P values for genome-wide inflation (Fig. S2), a single SNP (red dot) on chromosome 7 displayed a highly significant association with CQ susceptibility ($P < 1E-11$; PfCRT C350R; arrow). (B) *pfCRT*-edited clones and control reference lines 7G8 and D10 were assayed for their susceptibilities to CQ and its active in vivo metabolite monodesethyl-CQ (mdCQ). IC₅₀ values are represented as means \pm SEM. Each line was assayed on at least eight separate occasions in duplicate (Table S1). (C) IC₅₀ values for *P. falciparum* isolates from French Guiana (means \pm SEM). Horizontal dashed lines in B and C denote the resistance threshold of 100 nM. *** $P < 0.0001$ relative to (B) 7G8^{7G8} or (C) PfCRT C350 isolates (Student t test). (D) Decreasing prevalence of CQR isolates from 1997 to 2012 and its inverse relationship with the increasing prevalence of isolates harboring PfCRT C350R (continuous line). Only isolates carrying the PfCRT SVMNT haplotype at amino acids 72–76 were included in the analysis.

isolates sampled during this 16-y period. These results confirmed that the standard molecular markers, notably PfCRT K76T and to a lesser degree, PfMDR1, are no longer predictive of CQR in French Guiana.

Genome-Wide Association Study Identifies PfCRT C350R as the Single Mutation Associated with CQ Susceptibility. To identify the genomic variants associated with the reversion of CQR in mutant isolates harboring PfCRT K76T, we performed whole-genome sequence analysis of 54 culture-adapted isolates obtained from distinct malaria-infected patients in French Guiana between 2009 and 2013. We then performed a genome-wide association study (GWAS) on a final dataset of 35 isolates [18 CQ-sensitive (CQS) and 17 CQR parasites] containing 34,196 SNPs (Figs. S1 and S2). Strikingly, a single locus on chromosome 7 achieved genome-wide significance for association with CQS: a Tgt/Cgt nonsynonymous substitution in exon 10 of the *pfCRT* gene that leads to the replacement of a cysteine by an arginine at codon 350 (C350R) (Fig. 2A).

Genome Editing and Molecular Surveys Show That PfCRT C350R Is Responsible for a Loss of CQR. To assess the impact of PfCRT C350R, we edited the *pfCRT* gene in the CQR reference strain 7G8. This Brazilian strain carries the canonical South American PfCRT (SVMNT) and PfMDR1 (NFCDY) haplotypes that are shared by the vast majority of isolates from French Guiana. 7G8 parasites that expressed either the recombinant 7G8 allele (7G8^{7G8}; transfection control) or the 7G8 variant containing the C350R mutation (7G8^{C350R}) were generated using *pfCRT*-specific zinc finger nucleases as previously described (18) (Fig. S3). Recombinant clones were obtained by limiting dilution and validated using PCR and sequencing. Drug assay data showed that the PfCRT C350R mutation caused a 24-fold reduction in the mean CQ IC₅₀ values from 380 nM in the reference 7G8^{7G8} clone to 16 nM in the 7G8^{C350R} variant ($P < 0.0001$, Student t test) (Fig. 2B). A similar reversal of resistance to monodesethyl-CQ, the active in vivo metabolite of CQ, was observed. Parallel studies with parental 7G8 parasites yielded a mean CQ IC₅₀ value of 386 nM, indicating that the expression of the cDNA *pfCRT* locus (lacking most introns) did not itself cause a significant shift in CQ IC₅₀ values. Of note, the 7G8^{C350R} clone showed a similar mean CQ IC₅₀ value as the reference CQS strain D10 (Papua New Guinea; mean IC₅₀ of 19 nM) that harbors the PfCRT CVMNK WT sequence.

In parallel, we examined the association of the C350R mutation with CQ susceptibility in PfCRT K76T mutant isolates in a

large set of isolates collected between 1997 and 2012. Exons 2 and 10 were sequenced from 580 isolates. Biallelic samples (C350 + 350R; $n = 7$) were excluded from the analysis because of a putatively biased IC₅₀ value. All PfCRT C350R mutant isolates ($n = 168$) were found to be CQS, with a mean CQ IC₅₀ of 23 nM. This value is significantly lower than the mean CQ IC₅₀ value of 160 nM observed with PfCRT C350 parasites ($n = 405$; $P < 0.0001$) (Fig. 2C). Altogether, these results provide compelling evidence that the emergence of the PfCRT C350R mutation is primarily responsible for the recent gain of CQ susceptibility in PfCRT K76T isolates from French Guiana.

PfCRT C350R Emerged in 2002 and Then, Rapidly Spread Throughout the Parasite Population in French Guiana. Only 54% of the CQS isolates with the PfCRT SVMNT sequence harbored the additional C350R mutation in the combined dataset. However, this general picture obscures important temporal disparities. Although it took 5 y after the official withdrawal of CQ to observe a significant decrease of CQR (i.e., in 2000), interestingly, the first PfCRT C350R isolate was not detected until 2 y later in 2002 (Fig. 2D). Thereafter, the prevalence of PfCRT C350R in the total parasite population increased rapidly from 2.7% in 2002 up to 58% in 2012. We note that 100% of the CQR isolates harbored K76T and the C350 residue. Among the SVMNT CQS isolates (defined as CQ IC₅₀ < 100 nM), the prevalence of PfCRT C350R increased from 5% in 2002 to 83% in 2012; the few other CQS C350 isolates nonetheless showed a significantly higher mean CQ IC₅₀ than the CQS C350R isolates (62 vs. 23 nM, respectively; $P < 0.001$).

Significant Impact of the PfCRT C350R Mutation on Decreased PPQ Susceptibility. Because PfCRT is known to modulate *P. falciparum* response to diverse antimalarial drugs, we investigated whether the C350R mutation had an impact on other drug susceptibilities in both the 7G8 genome-edited lines and field isolates collected during the 2008–2012 period (Fig. 3). For all tested compounds, the 7G8^{7G8} modified clone displayed IC₅₀ values similar to the 7G8 parental line, confirming that the *pfCRT* gene editing did not affect drug responses. Introduction of the PfCRT C350R mutation had no effect on pyronaridine response but significantly increased 7G8 susceptibilities to monodesethyl-AQ (mdAQ), QN, MQ, and lumefantrine (LUM) by 2- to 4-fold ($P < 0.001$) and induced a moderate but significant 1.6-fold increase in artesunate susceptibility (3.5 vs. 2.2 nM for 7G8^{7G8} and 7G8^{C350R}, respectively; $P < 0.05$). A significant effect of C350R on PPQ response was also observed, with the 7G8^{C350R} clone showing a 1.4-fold decreased

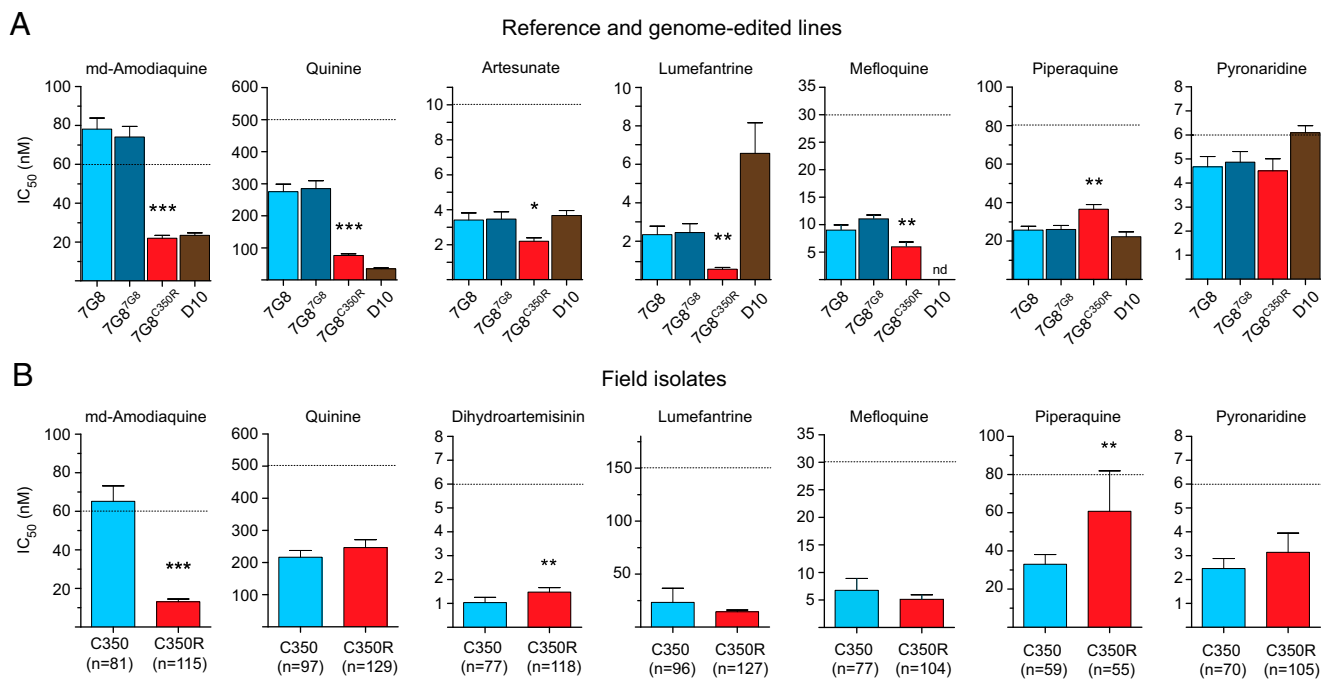


Fig. 3. Impact of PfCRT C350R on antimalarial drug responses (means \pm SEM). IC₅₀ values are shown for (A) genome-edited and reference lines (assayed on four to nine separate occasions in duplicate) (Table S1) and (B) French Guianan field isolates from 2008 to 2012. All isolates analyzed in B have the PfCRT SVMNT haplotype at amino acids 72–76. Genome-edited lines or field isolates harboring PfCRT C350R show concordant results in their higher susceptibilities to CQ and mdaQ, contrasting with a decreased susceptibility to PPO. Asterisks denote the significance level of the difference (A) between 7G8^{7G8} and 7G8^{C350R} or (B) between PfCRT C350R and C350 isolates (Student t test). nd, not determined. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

susceptibility (mean PPO IC₅₀ of 26 vs. 37 nM for 7G8^{7G8} and 7G8^{C350R}, respectively; $P < 0.001$) (Fig. 3A and Table S1).

French Guianan isolates showed a quite different pattern of drug susceptibilities (Fig. 3B). As expected, C350R mutant isolates were also found to be highly susceptible to mdaQ. Unlike the 7G8 genome-edited lines, no differences in QN, MQ, and LUM susceptibilities were found. However, a moderate but significant association between the presence of the C350R mutation and a decrease in DHA susceptibility was observed (1.0 vs. 1.5 nM for C350 and C350R, respectively; $P < 0.001$). C350R mutant isolates also displayed a significantly lower susceptibility to PPO compared with WT C350 isolates (mean IC₅₀ of 61 vs. 33 nM for C350R and C350, respectively; $P < 0.001$). Overall, both the genome-edited 7G8^{C350R} line and field isolates harboring a PfCRT SVMNT + C350R haplotype showed concordant results in their higher susceptibilities to CQ and mdaQ in contrast with their decreased susceptibilities to PPO.

Discussion

In French Guiana, the prevalence of CQR has decreased significantly after CQ withdrawal, a pattern also noted in many other endemic areas worldwide (10–13). Here, we show that this phenotypic reversion is caused by the acquisition of a single mutation in the *pfcr* gene that completely abolishes the effect of the K76T resistance mutation as opposed to the alternative scenario of the WT allele reemerging.

Repopulation by an allele is driven by multiple parameters, including initial frequency, population size, and the allele's selective advantage. Our findings clearly show that the WT PfCRT CVMNK haplotype has been purged from the entire population and that the few cases of imported parasites from Africa or Haiti were not sufficient to initiate colonization. The return to CQ susceptibility was not as straightforward as in Malawi, where CQR has completely disappeared, and it has been proposed that CQ treatment could be reintroduced (19). In addition to the fact that an additional mutation had to emerge and then spread in French Guiana, the differential rate of CQR reversal might be

related to the clear differences in transmission intensity, population dynamics, and history of drug use between these two settings. In French Guiana, 18 y after CQ withdrawal, 25% of isolates are still CQR in vitro, precluding the reintroduction of CQ as antimalarial treatment.

Two studies have reported the emergence of polymorphisms nearby C350R in PfCRT after in vitro drug selection experiments on CQR strains. Using the 106/1⁷⁶¹ line, QN single-step selection experiments generated lines with an additional PfCRT Q352K or Q352R mutation that had acquired QN resistance but simultaneously regained CQ susceptibility (20). Separately, in vitro selection for resistance to the IDI-3783 compound that is selectively active against CQR parasites resulted in acquisition of the Q352R mutation in PfCRT (and concomitantly, a loss of CQR), thus providing a conceptual framework for the development of combination therapies that would exploit this evolutionary trap (21). These mutations occur in *pfcr* exon 10, which corresponds to amino acid substitutions in transmembrane domain 9. This domain is postulated to function in substrate binding and translocation, similar to transmembrane domain 1, which contains the K76T substitution (20, 22–24). The functional hypothesis for the regained in vitro CQ susceptibility by acquisition of mutations in exon 10 is the reintroduction of a positive charge (K and R) that would inhibit the binding of CQ and block its extrusion from the digestive vacuole. Therefore, an important finding of our study is the demonstration that these particular adaptive mechanisms observed in individual strains during in vitro experiments can also be selected in natural parasite populations where drug resistance alleles are fixed.

Examining the temporal changes in PfCRT haplotype diversity, we note that, between 2001 and 2003, the majority of CQS field isolates did not harbor the C350R mutation. By 2012, however, almost all of the susceptible parasites harbored the PfCRT C350R mutation, implying strong selection for this variant. These results suggest the existence of additional determinants accounting for the loss of CQR in the early 2000s. In another study that examined how the parasite genetic background dictates the degree of mutant *pfcr*-mediated CQR, the WT *pfcr*

allele in CQS strains was replaced by the mutant 7G8-type *pfcr*t (25). The 3D7^{7G8}- and D10^{7G8}-transfected lines exhibited only a modest increase in their CQ IC₅₀ values. Nonetheless, these mutant lines were able to withstand high concentrations of CQ and showed delayed recrudescence in culture after high CQ exposure, indicative of a CQ tolerance phenotype. Interestingly, two CQS isolates from French Guiana with the PfCRT SVMNT haplotype were assayed in the same study. The isolate G224 (exhibiting PfCRT C350) also displayed the characteristics of CQ tolerance, whereas the other isolate, H209 (exhibiting PfCRT C350R), had a more typical CQS phenotype. From these previous results and our own observation that the few CQS isolates with WT PfCRT C350 are significantly less susceptible to CQ than the PfCRT C350R isolates, we can hypothesize that these SVMNT PfCRT C350 isolates with a CQ IC₅₀ < 100 nM had a CQ-tolerant phenotype, having already lost robust resistance. Acquisition of full CQ susceptibility would, therefore, be a multistep process that proceeds by an accumulation of adaptive changes, including mutations acquired at other loci, with PfCRT C350R being the final step of a complete CQR reversal.

The successive implementation over time of various first-line drugs after the official cessation of CQ use (Fig. 1) has created a complex selection landscape operating on the *pfcr*t gene, which is known to impact the efficacy of multiple antimalarials (20, 26). Our drug profiling data showed a significant loss of mdaQ resistance in field isolates harboring the PfCRT C350R mutation, consistent with earlier reports that highlighted the close correlation between CQ and mdaQ responses of PfCRT SVMNT parasites from South America (14). Our observation that mutant C350R isolates were nominally less susceptible to DHA, however, should be interpreted with caution, notably because in vitro artemisinin susceptibilities, as measured using IC₅₀ values, do not correlate with the clinical phenotype of delayed parasite clearance rates in southeast Asia (27, 28).

Our genome-edited 7G8^{C350R} line displayed increased susceptibility to multiple drugs, including mdaQ (as noted above for C350R-carrying field isolates), QN, MQ, artesunate, and LUM. This result reveals a pleiotropic role for this recently emerged *pfcr*t allele in modulating parasite susceptibility to clinically important antimalarials. This role differs from what is generally observed in Africa with the PfCRT CVIET haplotype or even the PfCRT SVMNT haplotype in Papua New Guinea (29, 30). This effect of C350R on QN and MQ, however, was not replicated in field isolates, underscoring a complex genetic basis of susceptibility in the field. Another primary determinant of susceptibility to these drugs in *P. falciparum* is the *pfmdr1* gene, which in French Guiana harbors the 86N and 184F residues that are associated with increased LUM susceptibility (31, 32). Of note, all isolates remained highly susceptible to LUM, a finding that argues for maintaining the artemether + LUM combination as first-line therapy in the region.

Finally, our data provide evidence that the *pfcr*t genotype impacts PPQ response. These results suggest that the PPQ pressure exerted by the erratic consumption of Artecom (DHA + PPQ + TMP) by thousands of illegal gold miners in French Guiana since 2002 might be one of the selective forces that drove the expansion of the PfCRT C350R allele during this same period and as a consequence, the return of CQ susceptibility. In fact, miners on the Guiana Shield readily cross borders between Brazil, French Guiana, and Suriname and regularly automate with Artecom (33–35). This clue to the putative mechanism of resistance to PPQ is potentially of considerable importance, because PPQ treatment failure is a major and increasing concern in southeast Asia (36–38). Therefore, the association between PfCRT haplotypes and PPQ treatment failure should be further explored in southeast Asia, where polymorphisms in the *pfcr*t gene, notably in exon 10, were found to accompany mutations in the *pfk13* gene associated with artemisinin resistance (39). Given that increased PPQ pressure is likely under mass drug administration campaigns that use DHA–PPQ, it would be also important

to monitor parasite changes at the entire *pfcr*t locus that may result in reduced PPQ susceptibility.

In conclusion, this work illustrates a unique evolutionary path taken by the *pfcr*t gene as a consequence of an altered drug policy. In the virtual absence of the competing WT, sensitive *pfcr*t allele, drug susceptibility evolved through the acquisition of an additional amino acid substitution rather than reversion of an existing mutation, such as the critical CQR marker K76T. The extent of this particular mechanism of CQR reversion, described here for the first time to our knowledge, should be further assessed to determine whether it reflects a local evolutionary event or is also happening in other settings or at larger scales. Finally, we provide evidence that, in regions where *P. falciparum* parasite populations are small and malaria elimination efforts will be targeted, the usefulness of standard molecular markers for drug resistance will require periodic phenotypic validation to contend with ongoing parasite evolution.

Materials and Methods

Origin and Collection of French Guianan Isolates. *P. falciparum* isolates were collected between 1994 and 2013 from symptomatic patients diagnosed throughout the network of hospitals, medical laboratories, and health centers in French Guiana. The GWAS samples were collected during 2009–2013. To ensure clonality before whole-genome sequencing, isolates were either assayed with a subset of 15 SNPs from a 24-SNP barcode (40) and confirmed as monoclonal or cloned by limiting dilution.

Drug Assays. The phenotypes of the isolates were determined ex vivo (i.e., directly after patient blood sampling) or in vitro (after parasite multiplication in culture for several days). The ex vivo method was applied if, at the time of starting phenotypic analysis, the isolate exhibited (i) a *P. falciparum* infection without concomitant *P. vivax* infection, (ii) a parasitemia greater than 0.05%, (iii) an interval of less than 4 d between sampling and analysis, and (iv) a quantity of blood sufficient to run the method. Parasite growth was determined by incorporation of tritiated hypoxanthine using a 42-h standard 96-well candle jar method (41). French Guianan culture-adapted clones selected for whole-genome sequencing were assayed in a controlled gas atmosphere with 5% (vol/vol) CO₂, 10% (vol/vol) O₂, and 85% (vol/vol) N₂. For 7G8 and D10 clones, in vitro 72-h drug dose–response assays were performed, and parasite growth was determined using flow cytometry with SYBR Green I and Mito-Tracker Deep Red (42). Mean IC₅₀ ± SEM values and numbers of repeats are listed in Table S1. Statistical significance of differences between mean IC₅₀ values was assessed using Student *t* tests.

DNA Extraction and Genotyping. Genomic DNA was prepared using the QIAmp DNA Blood Kit (Qiagen). Conditions for PCR and targeted sequencing of *pfcr*t exon 2 (harboring codons 72–76) and polymorphic regions of *pfmdr1* were previously described (16). A 121-bp fragment encompassing the complete exon 10 of *pfcr*t (harboring codon 350) was PCR-amplified and Sanger-sequenced.

Whole-Genome Sequencing and the GWAS. DNA samples were made into 200-bp Illumina fragment libraries by the Broad Institute Genomics Platform and sequenced with paired-end 101-bp reads on an Illumina HiSeq2000 instrument using V2 chemistry. This design yielded a 70-fold mean coverage, a level sufficient to perform SNP calling. Reads were processed through the Picard sequencing analysis pipeline at the Broad Institute, generating standard sequencing metrics and demultiplexed sample-specific sequencing read BAM (Binary Alignment Map) files. Reads were aligned to the 3D7 reference assembly (PlasmoDB v9.0) using BWA (43), and SNPs were called using the GATK Unified Genotyper (44). Heterozygous SNP calls were discarded along with all calls exhibiting QUAL (quality scores) < Q30. Principal components analysis on called SNPs led to the exclusion of six confounders because of perfect genome identity (*n* = 4; implying clonal infection in different patients) and population stratification (*n* = 2; outliers) to find an unstructured sample of unique individual genomes (Fig. S1). We further filtered the dataset to exclude samples exhibiting either a low fraction of genotypable bases because of low sequencing coverage or SNP sites exhibiting a call rate of less than 50% in the remaining samples and/or a minor allele frequency of less than 10%. Samples were excluded from the GWAS if they exhibited calls for fewer than 90% of the SNP loci matching the criteria just described. The GWAS was performed in PLINK v1.07 (pungu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/) (45). To avoid false-positive associations, we applied a genomic control correction to adjust *P* values for genome-wide inflation (Fig. S2).

Generation of *pfcr*-Edited 7G8 Clones. To generate recombinant isogenic lines differing only at their *pfcr* locus, we used a previously validated zinc finger nuclease-mediated genome editing strategy (18). A schematic and a description of this approach are shown in Fig. S3.

Ethical Considerations. Analyzed samples were all obtained by blood collections performed as part of the standard medical care for any patient presenting with fever on hospital admission in French Guiana. Specimen collection complied with Article L.1211-2 and related articles of the French Public Health Code, which states that biobanking and secondary use for scientific purpose of remaining human clinical samples are justified with the informed consent of the patient. Moreover, in compliance with French legislation (article L.1243-3 and related articles of the French Public Health Code), samples received at the Malaria NRC (National Reference Center) had been registered for research purposes in the

NRC Biobank declared to both the French Ministry for Research and a French Ethics Committee, which both approved and registered this thematic biobank (declaration number DC-2010-1223; collection no. 2). No institutional review board approval is required according to the French legislation.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Denis Blanchet, Bernard Carme, Magalie Demar, Félix Djossou, Claire Grenier, Michel Joubert, and Rachida Boukhari for contributions to the sample collection. This work was supported by European Commission Grant REGPOT-CT-2011-285837-430 STRonGer (to S.P.), Agence Nationale de la Recherche Investissements d'Avenir Grant ANR-10-LABX-25-01 (to S.P. and L.M.), NIH Grants R01A150234 (to D.A.F.) and R01A1109023 (to D.A.F.), and the Institut de Veille Sanitaire. Sequencing was supported, in part, by National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Department of Health and Human Services Contract HHSN272200900018C.

- Naidoo I, Roper C (2013) Mapping 'partially resistant', 'fully resistant', and 'super resistant' malaria. *Trends Parasitol* 29(10):505–515.
- Ashley EA, et al.; Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC) (2014) Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 371(5):411–423.
- Obaldia N, 3rd, et al. (2015) Clonal outbreak of *Plasmodium falciparum* infection in eastern Panama. *J Infect Dis* 211(7):1087–1096.
- Volkman SK, et al. (2007) A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet* 39(1):113–119.
- Musset L, et al. (2014) Malaria on the Guiana Shield: A review of the situation in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(5):525–533.
- WHO (2014) *World Malaria Report* (WHO, Geneva).
- Adhin MR, Labadie-Bracho M, Bretas G (2013) Molecular surveillance as monitoring tool for drug-resistant *Plasmodium falciparum* in Suriname. *Am J Trop Med Hyg* 89(2): 311–316.
- Griffing S, et al. (2010) *pfmdr1* amplification and fixation of *pfcr* chloroquine resistance alleles in *Plasmodium falciparum* in Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother* 54(4):1572–1579.
- Vieira PP, et al. (2004) *pfcr* Polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *J Infect Dis* 190(2): 417–424.
- Mekonnen SK, et al. (2014) Return of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* parasites and emergence of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Ethiopia. *Malar J* 13:244.
- Laufer MK, et al. (2010) Return of chloroquine-susceptible *falciparum* malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *J Infect Dis* 202(5):801–808.
- Mbogo GV, et al. (2014) Temporal changes in prevalence of molecular markers mediating antimalarial drug resistance in a high malaria transmission setting in Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 91(1):54–61.
- Mohammed A, et al. (2013) Trends in chloroquine resistance marker, *Pfcr*-K76T mutation ten years after chloroquine withdrawal in Tanzania. *Malar J* 12:415.
- Sá JM, et al. (2009) Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(45):18883–18889.
- Petersen I, et al. (2015) Balancing drug resistance and growth rates via compensatory mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. *Mol Microbiol* 97(2):381–395.
- Legrand E, et al. (2012) Discordant temporal evolution of *Pfcr* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium falciparum* *in vitro* drug susceptibility to 4-aminoquinolines after drug policy change in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother* 56(3): 1382–1389.
- Dedet JP, Germanetto P, Cordoliani G, Bonnevie O, Le Bras J (1988) *In vitro* activity of various antimalarials (chloroquine, amodiaquine, quinine and mefloquine) against 32 isolates of *Plasmodium falciparum* in French Guiana. *Bull Soc Pathol Exot* 81(1):88–93.
- Straimer J, et al. (2012) Site-specific genome editing in *Plasmodium falciparum* using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Methods* 9(10):993–998.
- Frosch AE, et al. (2014) Return of widespread chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* to Malawi. *J Infect Dis* 210(7):1110–1114.
- Cooper RA, et al. (2007) Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Mol Microbiol* 63(1):270–282.
- Lukens AK, et al. (2014) Harnessing evolutionary fitness in *Plasmodium falciparum* for drug discovery and suppressing resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(2):799–804.
- Martin RE, Kirk K (2004) The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Mol Biol Evol* 21(10): 1938–1949.
- Bellanca S, et al. (2014) Multiple drugs compete for transport via the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter at distinct but interdependent sites. *J Biol Chem* 289(52):36336–36351.
- Zhang H, Paguio M, Roepe PD (2004) The antimalarial drug resistance protein *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter binds chloroquine. *Biochemistry* 43(26):8290–8296.
- Valderramos SG, et al. (2010) Identification of a mutant *PfCRT*-mediated chloroquine tolerance phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog* 6(5):e1000887.
- Johnson DJ, et al. (2004) Evidence for a central role for *PfCRT* in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell* 15(6):867–877.
- Witkowski B, et al. (2013) Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *In vitro* and *ex vivo* drug-response studies. *Lancet Infect Dis* 13(12):1043–1049.
- Dondorp AM, et al. (2009) Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361(5):455–467.
- Mwai L, et al. (2009) *In vitro* activities of piperazine, lumefantrine, and dihydroartemisinin in Kenyan *Plasmodium falciparum* isolates and polymorphisms in *pfcr* and *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(12):5069–5073.
- Wong RP, et al. (2010) *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to conventional and novel antimalarial drugs in Papua New Guinea. *Trop Med Int Health* 15(3): 342–349.
- Sisowath C, et al. (2009) *In vivo* selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible *pfcr* K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *J Infect Dis* 199(5):750–757.
- Conrad MD, et al. (2014) Comparative impacts over 5 years of artemisinin-based combination therapies on *Plasmodium falciparum* polymorphisms that modulate drug sensitivity in Ugandan children. *J Infect Dis* 210(3):344–353.
- de Theije M, Heemskerk M (2009) Moving frontiers in the Amazon: Brazilian small-scale gold miners in Suriname. *Eur Rev Latin Am Carib* 87:5–25.
- Evans L, 3rd, et al. (2012) Quality of anti-malarials collected in the private and informal sectors in Guyana and Suriname. *Malar J* 11:203.
- Nacher M, et al. (2013) Made in Europe: Will artemisinin resistance emerge in French Guiana? *Malar J* 12:152.
- Saunders DL, Vanachayangkul P, Lon C; US Army Military Malaria Research Program; National Center for Parasitology, Entomology, and Malaria Control (CNM); Royal Cambodian Armed Forces (2014) Dihydroartemisinin-piperazine failure in Cambodia. *N Engl J Med* 371(5):484–485.
- Lim P, et al. (2015) Decreasing *pfmdr1* copy number suggests that *Plasmodium falciparum* in Western Cambodia is regaining *in vitro* susceptibility to mefloquine. *Antimicrob Agents Chemother* 59(5):2934–2937.
- Leang R, et al. (May 26, 2015) Evidence of *falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia: Dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrob Agents Chemother*, AAC.00835-15.
- Miotto O, et al. (2015) Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet* 47(3):226–234.
- Daniels R, et al. (2008) A general SNP-based molecular barcode for *Plasmodium falciparum* identification and tracking. *Malar J* 7:223.
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16(6):710–718.
- Eklund EH, Schneider J, Fidock DA (2011) Identifying apicoplast-targeting antimalarials using high-throughput compatible approaches. *FASEB J* 25(10):3583–3593.
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25(14):1754–1760.
- McKenna A, et al. (2010) The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20(9):1297–1303.
- Purcell S, et al. (2007) PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81(3):559–575.

Supporting Information

Pelleau et al. 10.1073/pnas.1507142112

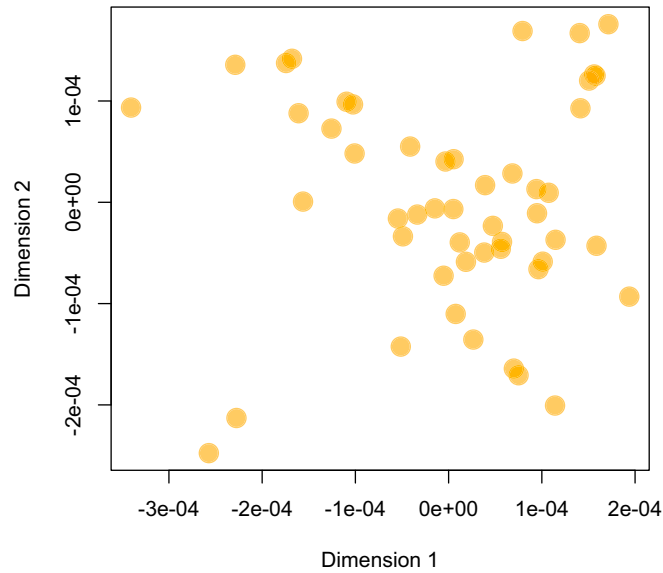


Fig. S1. Principal component analysis of a pairwise distance matrix between the genomes of parasites collected in French Guiana from 2008 to 2012. This two-component graph shows the relatively homogeneous distribution of the parasite genomes included in the study and the absence of population stratification.

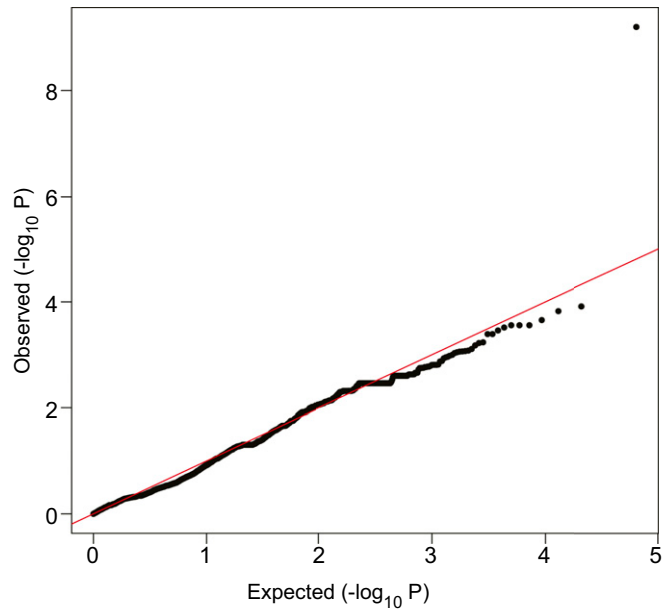


Fig. S2. Quantile–quantile plots of expected vs. observed P values of individual SNPs associated with the CQ-susceptible phenotype. This plot was generated after correction for inflated P values. The SNP with the most important deviation from the expected P value (upper right corner) corresponds to the PfCRT C350R mutation found in CQ-susceptible parasites.

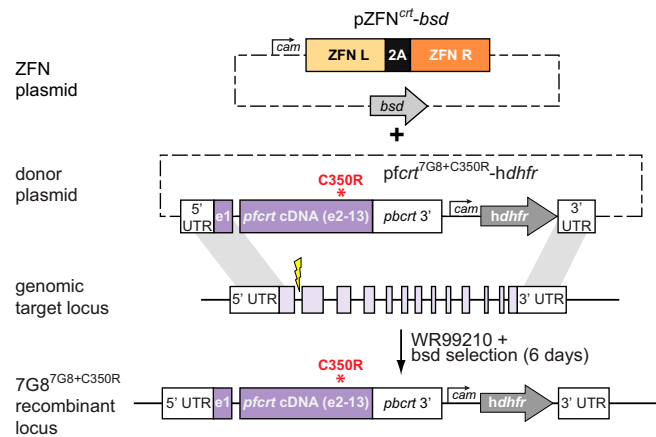


Fig. S3. Site-specific genome editing strategy to introduce *pfCRT* modifications into the 7G8 reference line; 7G8 parasites were electroporated with a donor plasmid (*pfCRT-hdhfr*) encoding a desired compacted (exons 2–13) *pfCRT* haplotype and pressured with 2.5 nM WR99210. Transformed parasites were subsequently electroporated with a zinc finger nuclease (ZFN) -encoding plasmid (pZFN^{cr}-*bsd*) and pressured for 6 d with 2.5 μg/mL BSD + 2.5 nM WR99210 followed by culture in 2.5 nM WR99210. Our *pfCRT*-specific ZFNs were linked using a viral 2A peptide that permits translation of the two separate ZFNs from a single transcribed mRNA. Binding of these customized DNA binding ZFNs to adjacent sites of intron 1 results in pairing of their split FokI endonucleases, which as an obligate heterodimer form, causes a double-stranded break in intron 1. These events are repaired using the donor template present on the second plasmid that contains 5' and 3' regions of homology with DNA resection and donor template strand invasion-dependent DNA repair and resynthesis, thus exchanging the endogenous *pfCRT* allele with the plasmid-borne variant that contains the entire coding sequence that removes all introns except for intron 1. The presence of ZFN binding site mutations on the plasmid sequences ensures that both the plasmid and the subsequently gene-edited locus are refractory to the ZFNs that can only cleave the original genomic copy. Editing of *pfCRT* was assessed by PCR analysis of bulk cultures. Cultures showing editing were cloned by limiting dilution and flow cytometrically assessed for growth after 20 d by SYBR Green I and MitoTracker Deep Red (Invitrogen) staining. Presence of the desired *pfCRT* sequence was validated by PCR and RT-PCR.

Table S1. Detailed antimalarial drug susceptibilities in genome-edited and reference lines

Drug and IC values (nM)	D10	7G8	7G8 ^{7G8}	7G8 ^{C350R}
CQ				
Mean IC ₅₀ ± SEM	19.5 ± 1.5	386.2 ± 24.8	379.6 ± 24.4	16.2 ± 1.8
Mean IC ₉₀ ± SEM	35.1 ± 3.8	694.0 ± 67.3	676.9 ± 65.7	46.3 ± 4.4
Nb of assays	8	8	8	8
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				<0.0001
mdCQ				
Mean IC ₅₀ ± SEM	35.1 ± 3.2	1,571.0 ± 228.0	1,559.5 ± 146.7	53.3 ± 5.7
Mean IC ₉₀ ± SEM	89.0 ± 10.9	2,273.2 ± 241.1	2,242.1 ± 237.8	179.1 ± 16.5
Nb of assays	8	9	9	9
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				<0.0001
mdAQ				
Mean IC ₅₀ ± SEM	24.2 ± 1.2	77.9 ± 9.0	73.9 ± 5.5	21.1 ± 1.5
Mean IC ₉₀ ± SEM	34.8 ± 3.3	122.9 ± 9.2	121.3 ± 9.1	34.6 ± 4.0
Nb of assays	8	8	8	8
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				<0.0001
QN				
Mean IC ₅₀ ± SEM	35.1 ± 2.2	275.4 ± 23.4	285.1 ± 24.2	76.4 ± 5.1
Mean IC ₉₀ ± SEM	151.8 ± 39.1	768.0 ± 83.5	847.6 ± 92.2	260.5 ± 19.6
Nb of assays	8	7	7	7
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				<0.0001
LUM				
Mean IC ₅₀ ± SEM	6.6 ± 1.6	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.5	0.6 ± 0.1
Mean IC ₉₀ ± SEM	19.8 ± 3.4	9.4 ± 0.9	9.7 ± 0.9	2.7 ± 0.3
Nb of assays	7	4	4	4
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				<0.01
MQ				
Mean IC ₅₀ ± SEM	nd	9.0 ± 0.9	11.1 ± 0.7	6.0 ± 0.9
Mean IC ₉₀ ± SEM	nd	27.4 ± 3.8	30.7 ± 3.9	20.4 ± 2.0
Nb of assays	nd	4	4	4
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				<0.01
AS				
Mean IC ₅₀ ± SEM	3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.4	2.2 ± 0.2
Mean IC ₉₀ ± SEM	8.0 ± 1.1	6.3 ± 0.9	6.7 ± 0.9	5.5 ± 0.4
Nb of assays	7	7	7	7
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				<0.05
PPQ				
Mean IC ₅₀ ± SEM	22.2 ± 2.6	25.6 ± 2.1	26 ± 2.1	36.5 ± 2.4
Mean IC ₉₀ ± SEM	43.1 ± 5.2	57.4 ± 3.6	60.0 ± 3.7	77.9 ± 7.2
Nb of assays	8	9	9	9
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				<0.001
PND				
Mean IC ₅₀ ± SEM	6.1 ± 0.3	4.7 ± 0.4	4.9 ± 0.4	4.5 ± 0.5
Mean IC ₉₀ ± SEM	10.1 ± 1.0	7.6 ± 0.5	8.7 ± 0.5	7.7 ± 0.5
Nb of assays	8	9	9	9
<i>P</i> value vs. 7G8 ^{7G8}				ns

Student *t* tests were used to compare 7G8^{7G8} with 7G8^{C350R} mean IC₅₀ values. AS, artesunate; mdCQ, mono-desethyl-CQ; Nb, number; nd, not determined; ns, not significant; PND, pyronaridine.

Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance

Luana C Mathieu^{1,2}, Horace Cox³, Angela M Early^{4,5†}, Sachel Mok^{6†}, Yasmine Lazrek¹, Jeanne-Celeste Paquet⁶, Maria-Paz Ade⁷, Naomi W Lucchi⁸, Quacy Grant³, Venkatachalam Udhayakumar⁸, Jean SF Alexandre⁹, Magalie Demar^{10,11}, Pascal Ringwald¹², Daniel E Neafsey^{4,5‡}, David A Fidock^{6,13‡}, Lise Musset^{1*}

¹Laboratoire de parasitologie, Centre Nationale de Référence du Paludisme, World Health Organization Collaborating Center for surveillance of antimalarial drug resistance, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, French Guiana; ²Ecole Doctorale n°587, Diversités, Santé, et Développement en Amazonie, Université de Guyane, Cayenne, French Guiana; ³Ministry of Public Health, Georgetown, Guyana; ⁴Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, United States; ⁵Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, United States; ⁶Department of Microbiology and Immunology, Columbia University Irving Medical Center, New York, United States; ⁷Department of Communicable Diseases and Environmental Determinants of Health, Pan American Health Organization/World Health Organization, Washington, United States; ⁸Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Center for Global Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, United States; ⁹Pan American Health Organization, Georgetown, Guyana; ¹⁰Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana; ¹¹Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale (EPAT), EA3593, Université de Guyane, Cayenne, French Guiana; ¹²Global Malaria Program, World Health Organization, Geneva, Switzerland; ¹³Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Columbia University Irving Medical Center, New York, United States

*For correspondence:
lisemusset@gmail.com

†These authors contributed
equally to this work

‡These authors also contributed
equally to this work

Competing interest: See
page 15

Funding: See page 15

Received: 11 August 2019

Accepted: 25 March 2020

Published: 12 May 2020

Reviewing editor: Dominique
Soldati-Favre, University of
Geneva, Switzerland

© Copyright Mathieu et al. This
article is distributed under the
terms of the [Creative Commons
Attribution License](#), which
permits unrestricted use and
redistribution provided that the
original author and source are
credited.

Abstract Antimalarial drug resistance has historically arisen through convergent *de novo* mutations in *Plasmodium falciparum* parasite populations in Southeast Asia and South America. For the past decade in Southeast Asia, artemisinins, the core component of first-line antimalarial therapies, have experienced delayed parasite clearance associated with several *pfk13* mutations, primarily C580Y. We report that mutant *pfk13* has emerged independently in Guyana, with genome analysis indicating an evolutionary origin distinct from Southeast Asia. *Pfk13* C580Y parasites were observed in 1.6% (14/854) of samples collected in Guyana in 2016–2017. Introducing *pfk13* C580Y or R539T mutations by gene editing into local parasites conferred high levels of *in vitro* artemisinin resistance. *In vitro* growth competition assays revealed a fitness cost associated with these *pfk13* variants, potentially explaining why these resistance alleles have not increased in frequency more quickly in South America. These data place local malaria control efforts at risk in the Guiana Shield.

eLife digest All recommended treatments against malaria include a drug called artemisinin or some of its derivatives. However, there are concerns that *Plasmodium falciparum*, the parasite that causes most cases of malaria, will eventually develop widespread resistance to the drug. A strain of *P. falciparum* partially resistant to artemisinin was seen in Cambodia in 2008, and it has since spread across Southeast Asia. The resistance appears to be frequently linked to a mutation known as *pfk13* C580Y.

Southeast Asia and Amazonia are considered to be hotspots for antimalarial drug resistance, and the *pfk13* C580Y mutation was detected in the South American country of Guyana in 2010. To examine whether the mutation was still circulating in this part of the world, Mathieu et al. collected and analyzed 854 samples across Guyana between 2016 and 2017. Overall, 1.6% of the samples had the *pfk13* C580Y mutation, but this number was as high as 8.8% in one region. Further analyses revealed that the mutation in Guyana had not spread from Southeast Asia, but that it had occurred in Amazonia independently.

To better understand the impact of the *pfk13* C580Y mutation, Mathieu et al. introduced this genetic change into non-resistant parasites from a country neighbouring Guyana. As expected, the mutation made *P. falciparum* highly resistant to artemisinin, but it also slowed the growth rate of the parasite. This disadvantage may explain why the mutation has not spread more rapidly through Guyana in recent years.

Artemisinin and its derivatives are always associated with other antimalarial drugs to slow the development of resistance; there are concerns that reduced susceptibility to artemisinin leads to the parasites becoming resistant to the partner drugs. Further research is needed to evaluate how the *pfk13* C580Y mutation affects the parasite's response to the typical combination of drugs that are given to patients.

Introduction

Malaria is an important parasitic disease that causes a high level of mortality worldwide. In 2018, malaria was estimated to have caused 405,000 deaths, most of them attributable to the virulent *Plasmodium falciparum* parasite species (*World Health Organization, 2019*). Most malaria cases occur in Sub-Saharan Africa, but Southeast Asia and South America are also affected. Since 2001, Artemisinin-based Combination Therapies (ACTs) have been the recommended first-line therapy for *P. falciparum* infection for almost all malaria-endemic areas (*World Health Organization, 2001*). ACTs combine an artemisinin derivative and one partner drug (most commonly lumefantrine, mefloquine, amodiaquine, piperaquine or pyronaridine). These treatments have contributed to a major reduction in malaria-related mortality and morbidity (*Eastman and Fidock, 2009; Carrara et al., 2006; Bhatt et al., 2015*). However, in 2008, the first instances of reduced artemisinin efficacy were described in western Cambodia (*Dondorp et al., 2009; Ashley et al., 2014*). Subsequent studies have documented the rapid spread of resistance throughout Southeast Asia (*Dondorp et al., 2009; Ashley et al., 2014; World Health Organization, 2018*). Resistance to artemisinin is partial and affects only rings (*World Health Organization, 2018*). Clinically, this partial resistance trait manifests as a parasite clearance half-life that exceeds 5.5 hr (*WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group, 2019*). This half-life represents the time required to achieve a two-fold reduction of the parasite biomass. Partial resistance also manifests as persistent parasitemia on day three with a complete clearance of parasites following full treatment with an artesunate monotherapy lasting seven days or with an ACT (*World Health Organization, 2018*). An analysis of *P. falciparum* parasites selected for artemisinin resistance *in vitro* as well as parasites from patients experiencing slow parasite clearance led to the identification of a genetic locus linked to resistance: a kelch domain-containing protein located on chromosome 13 (*pfk13*) (*Ariey et al., 2014*). To date, many missense mutations have been described in the BTP/POZ or kelch propeller domain-containing parts of this protein in clinical isolates, however only nine of them have been validated for artemisinin resistance (F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H and C580Y) (*World Health Organization, 2018*;

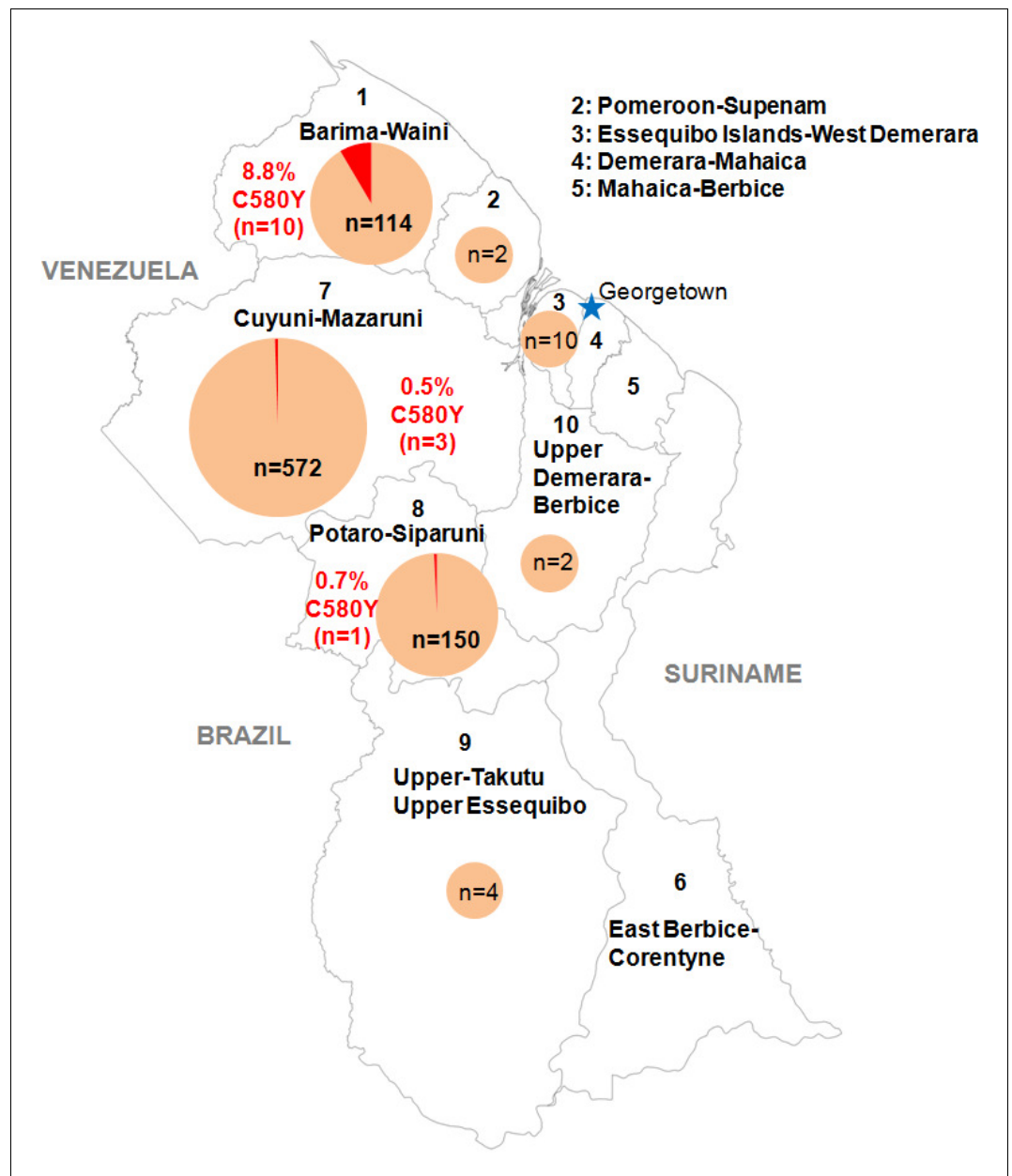


Figure 1. Distribution of the *pfk13* C580Y mutant parasites among Guyana regions. Pie charts represent the total number of isolates analyzed per region. Mutants are represented in red.

The online version of this article includes the following source data for figure 1:

Source data 1. Number of clinical samples with *pfk13* propeller segment WT or C580Y mutant, analyzed by sampling regions in Guyana from March 2016 to September 2017.

Ariey et al., 2014; Straimer et al., 2015). A larger number have been associated with delayed parasite clearance (*WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group, 2019*). In most locations, the *pfk13* C580Y mutation has overtaken other resistance-inducing variants, and it is now the most prevalent *pfk13* variant in Southeast Asia (*Ashley et al., 2014; Ariey et al., 2014*).

South America has historically been a second hotspot outside Southeast Asia for the evolution of antimalarial drug resistance. For example, chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine resistance evolved simultaneously in both regions (*Wootton et al., 2002; Roper et al., 2004*). The Guiana Shield region of South America, which includes Guyana, Suriname, French Guiana and parts of Brazil, Venezuela and Colombia, is important as a potential source of emerging antimalarial drug

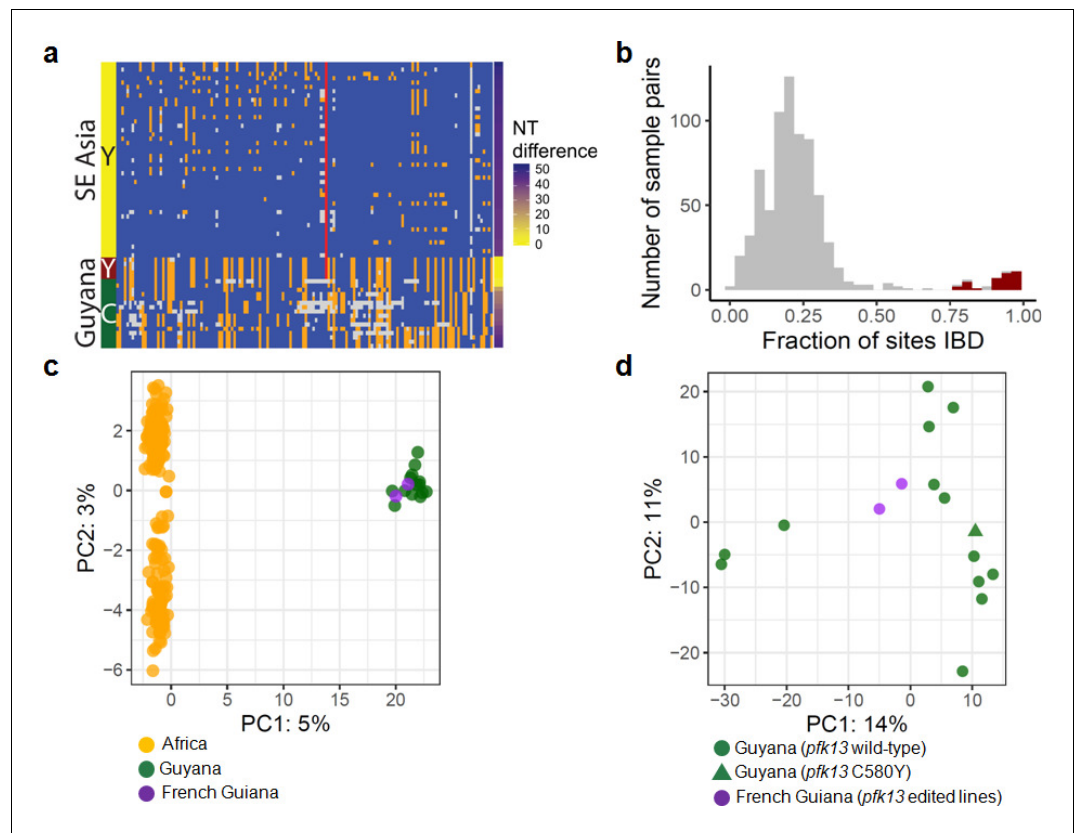


Figure 2. Whole-genome sequence analysis of *pfk13* C580Y mutant parasites in Guyana. (a) Comparison of the haplotypic background of *pfk13* C580Y mutant parasites from Guyana, 2016, and Southeast Asia, 2010–2012. Across Pf3k samples from Cambodia, Thailand, and Vietnam, 45 unique C580Y-coding haplotypic backgrounds were identified and compared to haplotypes from Guyana. Columns represent 149 sites containing non-singleton single nucleotide polymorphisms (SNPs) found within a 150 kb segment surrounding the *pfk13* C580Y-coding allele. At a given site, the more common allele is marked blue, the less common allele is orange, and missing calls are grey. The Y-coding variant for codon 580 of *pfk13* is represented by the red blocks; wild-type is blue. Only the five *pfk13* C580Y mutant samples with fewer than 15% missing calls are depicted here. (b) Analysis of relatedness at the whole-genome level among Guyana clones. Pairwise identity-by-descent (IBD) was estimated for all pairs of Guyana samples with high quality whole-genome sequence data (<70% missing calls). Pairwise comparisons between samples exhibiting the *pfk13* C580Y allele are indicated in red, and show uniformly high levels of relatedness, suggesting a single clonal lineage harboring the resistance mutation. (c, d) Principal components analysis of parasites from Guyana or other geographic regions using SNP calls from whole-genome sequence data. (c) The parasites from Guyana and French Guiana form a single cluster when compared with parasites from Africa. (d) The two edited parasite lines from French Guiana are highly similar to the sequenced parasite samples from Guyana including a *pfk13* mutant.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 2:

Figure supplement 1. Number of single nucleotide differences between pairs of parasites within different geographic locations.

resistance. In this region, the subsoil is rich in gold and other minerals, leading to extensive mining activities in forested areas. These mining activities favor malaria transmission, particularly *P. falciparum* (Douine et al., 2016; Heemskerk, 2011). Mining also generates human population movement and inappropriate use of ACTs, as people generally work deep in the forest, far from medical care (Pribluda et al., 2014; Douine et al., 2018). This erratic use of ACTs, as well as self-medication using ACTs of substandard quality or artemisinin monotherapies, may promote the emergence of resistance to artemisinin.

In Guyana in 2010, 5.1% (5 out of 98) of *P. falciparum*-infected clinical samples, sharing a common haplotype different from their Cambodian counterparts, exhibited the *pfk13* C580Y mutation

(Chenet *et al.*, 2016). However, no clinical or *in vitro* resistance phenotypes were measured or associated with the genotype data. The most recent therapeutic efficacy study conducted in Guyana in 2014 with 50 patients failed to identify *pfk13* mutations or delayed parasite clearance time after artemether/lumefantrine treatment (Rahman *et al.*, 2016). The sample size, however, was too small to ensure detection of low-frequency resistance mutations. The objective of the present study was to evaluate whether *pfk13* variants (C580Y or others) have persisted in Guyana since 2010, and if so, to evaluate their prevalence in 2016–2017. In the absence of available clinical phenotypes associated with the *pfk13* C580Y variant from patients infected and treated in this region, we evaluated the impact of two *pfk13* mutations, C580Y and R539T, on *in vitro* resistance and the rate of parasite growth in a South American parasite genetic background.

Results

Recent circulation of the *pfk13* C580Y mutation on a single clonal background

We genotyped the propeller domain of the *pfk13* gene by Sanger sequencing 854 samples collected between March 2016 and September 2017 from different malaria-endemic regions of Guyana. Fourteen samples bearing the *pfk13* C580Y variant were identified, representing a prevalence of 1.6% (CI₉₅0.8–2.5%). The prevalence of mutants was 8.8% (CI₉₅3.6–14.0%) in Region 1, 0.7% (CI₉₅0.0–2.0%) in Region 8 and 0.5% (CI₉₅0.0–1.1%) in Region 7 (Figure 1, Figure 1—source data 1). We also genotyped the sequence outside of the propeller domain for 283 samples. Among these, 57.2% (CI₉₅51.5–63.0%) were the 3D7 reference genotype, 42.0% (CI₉₅36.3–47.8%) carried the *pfk13* K189T mutation and 0.7% (CI₉₅0.0–1.7%) had a mixed genotype (wild-type/K189T). All samples bearing the *pfk13* C580Y variant also exhibited the *pfk13* K189T mutation, which to date has not been associated with artemisinin resistance.

To understand the origin of the C580Y mutation and examine the genetic relatedness of the mutant strains, we performed whole-genome sequencing (WGS) on thirteen of the fourteen Guyana samples exhibiting the *pfk13* C580Y mutation, as well as 40 comparator samples exhibiting wild-type *pfk13* and collected at comparable locations and times. The variant profile observed in the sequenced samples identified that the *pfk13* C580Y variant arose on a single Guyanese parasite genetic background, and was not imported from Southeast Asia (Figure 2a). Deeper examination of the genomic similarity was performed by estimating the proportion of the genome that was identical-by-descent between sample pairs. This analysis revealed an extremely high level of relatedness between sample pairs bearing *pfk13* C580Y (identity by descent (IBD) >0.77) relative to pairwise comparisons containing at least one wild-type *pfk13* sample (Figure 2b). This indicates that the parasite lineage on which C580Y arose in Guyana in 2010 probably engaged in limited sexual outcrossing with other parasite lineages in Guyana, despite having persisted for a sufficient duration of time to be observed in multiple regions of the country and to have risen to a non-negligible frequency in the Region 1 population.

In the 75 kb segments flanking the 2016–2017 C580Y-coding variant, WGS identified only two low-quality single nucleotide variants among the 13 mutant samples (Figure 2a). We also analyzed *pfk13* C580Y parasites using eight microsatellite loci flanking the *pfk13* gene. Despite missing data for some loci in some samples, two different haplotypes were identified, differing at one locus positioned at –6.36 kb (Table 1). The previously identified Guyana A mutant haplotype (Chenet *et al.*, 2016) matched the most common haplotype in the 2016–2017 samples, which was markedly distinct from the one observed in *pfk13* Cambodian mutants (Chenet *et al.*, 2016). The second 2016 haplotype exhibiting the 280 allele at the locus –6.36 kb has not been previously identified. As replicate genotyping efforts reproduced the allelic variant at locus –6.36, it is likely that a *de novo* microsatellite mutation occurred at locus –6.36 following the origin of the C580Y mutation. The high similarity of the microsatellite haplotypes bearing C580Y between 2010 (Chenet *et al.*, 2016) and 2016 suggests that the chromosome 13 resistance haplotype, and perhaps the full clonal lineage, has persisted over this timespan, as several of the allelic markers associated with the C580Y mutation are rare in both studies (e.g. allele 277 at marker –6.36: 11%; allele 206 at marker –0.15: 9%; allele 244 at marker 72.3: 6% Chenet *et al.*, 2016). We were not able to procure remaining DNA from the samples collected in 2010 to determine whether the entire genomic background has been preserved

Table 1. *pfk13* microsatellite analysis of Guyanese and Cambodian isolates.

Name	Region	Year of collection	−31.9	−6.36	−3.74	−0.15	K13 ^o	3.4	8.6	15.1	72.3
T145	1	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T237	7	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T244	1	2016	203	280	170	NA	C580Y	138	NA	144	NA
T305	1	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T345	1	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T364	1	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T378	1	2016	203	277	170	206	C580Y	NA	262	144	244
T385	7	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T445	1	2016	203	277	170	206	C580Y	NA	262	144	244
T490	7	2016	203	280	170	206	C580Y	NA	262	144	244
T508	8	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T314	1	2016	NA	NA	NA	NA	C580Y	NA	NA	NA	NA
T649	1	2016	NA	NA	NA	NA	C580Y	NA	NA	NA	NA
GUY0183	1	2017	ND	ND	ND	ND	C580Y	ND	ND	ND	ND
T208	7	2016	203	280	152	192	WT	138	284	138	244
T265	7	2016	203	280	156	192	WT	102	262	144	238
T317	1	2016	NA	NA	156	190	WT	NA	262	144	244
T332	7	2016	NA	NA	154	190	WT	102	262	144	244
T504	8	2016	203	280	152	192	WT	138	284	138	244
T524	7	2016	NA	NA	170	192	WT	102	270	NA	NA
T634	8	2016	205	280	156	192	WT	102	262	144	238
T724	8	2016	203	280	154	192	WT	NA	284	138	240
Guyana A*	1 and 7	2010	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
Guyana B*	7	2010	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	240
MRA 1236*		2010	201	283	146	194	C580Y	130	286	138	NA
MRA 1240*		2011	201	283	146	194	R539T	122	264	138	244
MRA 1241*		2011	201	283	146	194	I453T	130	290	138	244
3D7			207	283	164	226	WT	160	274	147	242
7G8			225	280	158	196	WT	102	262	144	240

^oCodons 438–704, NA: No Amplification, ND: Not Done, *: Mutants from **Chenet et al., 2016** according to the new size-assignment for microsatellites.

intact as a clonal lineage between 2010 and 2016. However, the genotypes of the molecular markers for resistance (*pfcr1*, *pfdhps*, *pfdhfr* and *pfmdr1*) were also similar between 2010 and 2016 mutant samples (**Supplementary file 1**).

Evidence for a Guyana-specific genetic background of *pfk13* C580Y mutants

The observation of the C580Y mutation persisting in only one clonal lineage suggests that genomic background may be an important determinant of the emergence and persistence of *pfk13* propeller mutations in Guyana, as was previously observed in Southeast Asia (**Miotto et al., 2013; Miotto et al., 2015; Cerqueira et al., 2017; Amato et al., 2018**). We therefore compared the genetic background of 53 isolates from Guyana (40 *pfk13* wild-type and 13 *pfk13* C580Y) and the artemisinin-resistant background observed in Southeast Asian parasites, in order to explore whether

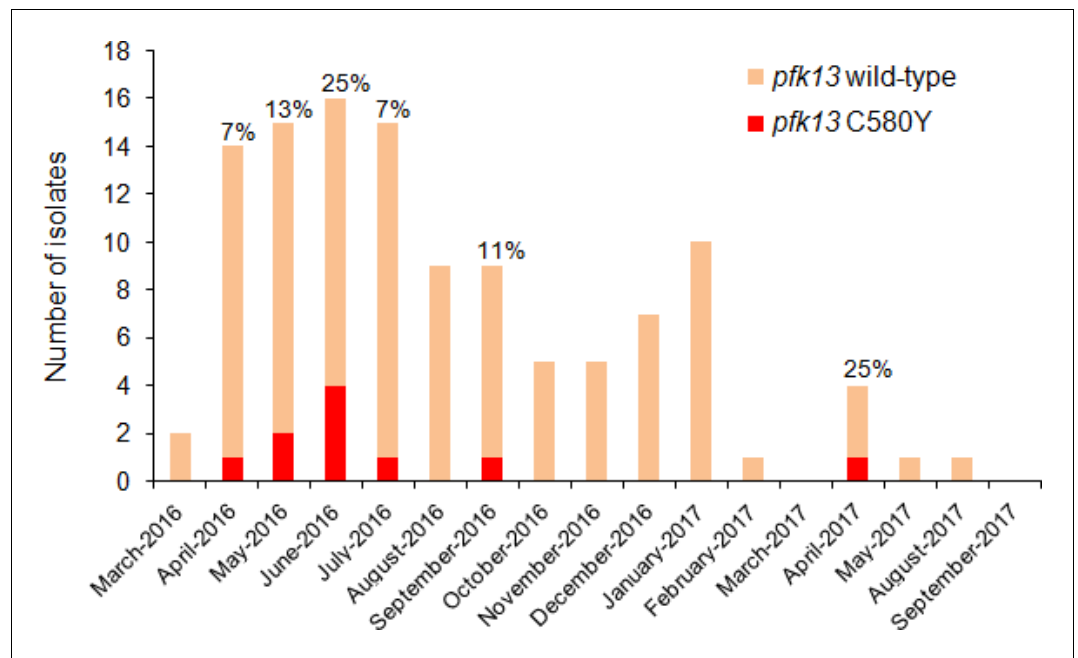


Figure 3. Temporal distribution of *pfk13* C580Y mutants in Region 1 of Guyana per month of collection, 2016–2017. The percentage of *pfk13* C580Y mutants for each month of identification is represented above each bar. The online version of this article includes the following source data for figure 3:

Source data 1. Number of clinical samples with *pfk13* WT or C580Y mutant alleles in Region 1 of Guyana from March 2016 to September 2017.

partner mutations associated with *pfk13*-mutant parasites may be responsible for the preservation of this clonal lineage (Miotto *et al.*, 2015). None of the previously described mutations were observed, including the *pfdd* D193Y, *pfcr1* N326S, *pfcr1* I356T, *pfarps* V127M and *pfmdr2* T484I variants. The *pfcr1* gene was of South American origin with a 7G8 haplotype comprising the mutations C72S, K76T, A220S, N326D and I356L, with no particular difference between wild-type and *pfk13* C580Y parasites (Supplementary file 1). However, within this candidate gene set, we observed two fixed differences between wild-type and *pfk13* C580Y parasites, both within the gene *PF3D7_1252100* (*RON3*) (Supplementary file 2). Although overall genotyping rates were low in this gene (successful for 15 out of 53), all genotyped *pfk13* C580Y mutants ($n = 5$) contained a V1661L-coding variant and all genotyped *pfk13* wild-type parasites ($n = 9$) carried a synonymous non-reference variant at codon 1801. We also analyzed other molecular markers for resistance (*pfcr1*, *pfdhps*, *pfdhfr* and *pfmdr1*) (Supplementary file 1). All *pfk13* C580Y variants were *pfcr1* SVMNT (72-76)/A220S/N326D/C350/I356L (i.e. the *pfcr1* 7G8 haplotype), *pfdhfr* double-mutant (N511/S108N), *pfdhps* triple-mutant (A437G/K540E/A581G) and *pfmdr1* triple-mutant (Y184F/N1042D/D1246Y). In summary, Guyanese parasites bearing *pfk13* C580Y also exhibited variants in genes previously associated with separate antimalarial drug resistance phenotypes in Southeast Asia.

A single *pfk13* C580Y clone has fluctuated through time without massive spreading

The highest prevalence of the Guyanese *pfk13* C580Y variant was found in Region 1. This variant was first observed in April 2016 and achieved a maximum prevalence of 25.0% (CI₉₅ 3.8–46.2%) in June 2016 (Figure 3, Figure 3—source data 1). Thereafter, it was not identified between September 2016 and March 2017 despite a constant transmission level of malaria in this region during this period. To understand these fluctuations in prevalence, we studied the parasite population dynamics in the country. We compared parasites from Guyana to samples from Africa and Southeast Asia (Supplementary file 3). At synonymous sites within 4888 genes, pairwise nucleotide diversity (π_{syn}) in Guyana was 3.4×10^{-4} , less than half the level observed in Southeast Asia (7.4×10^{-4}) and nearly a third of that measured in Africa (1.0×10^{-3}). In Guyana, 46 samples had sufficient sequencing

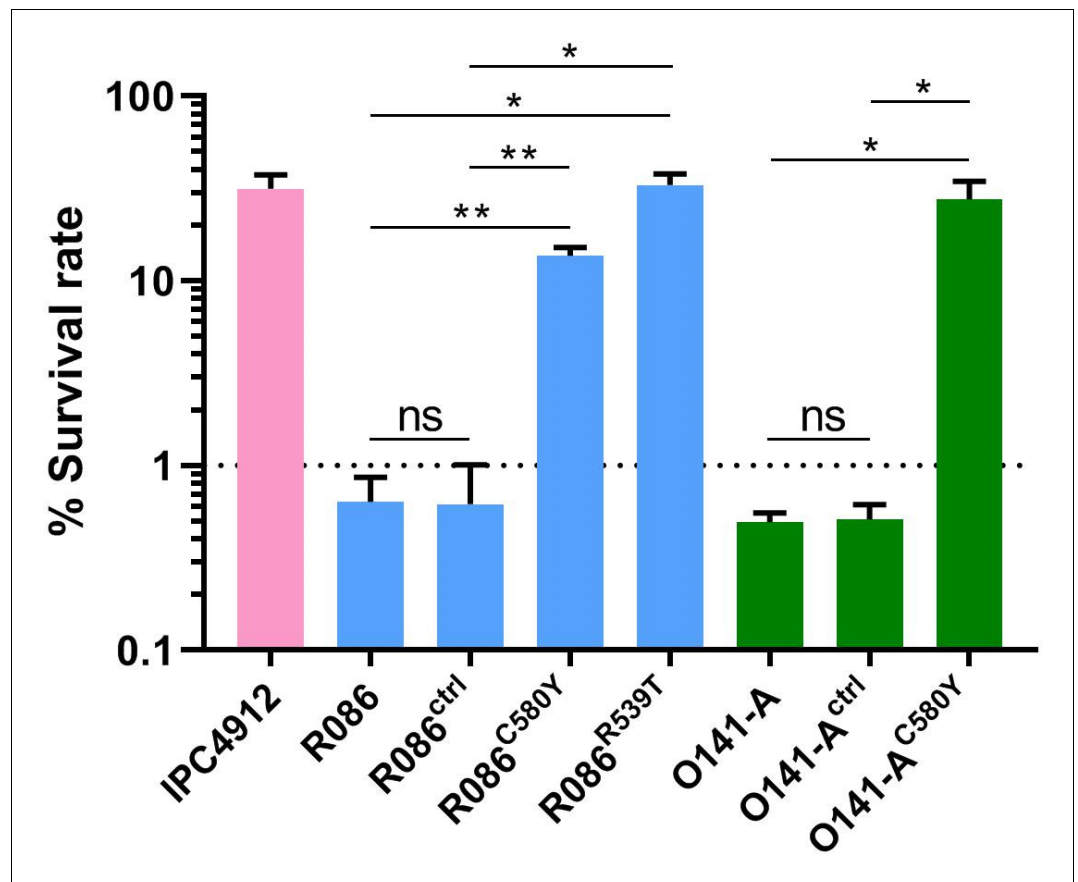


Figure 4. Ring-stage Survival Assays in parasites from French Guiana. Data show survival rates of ring-stage parasites (0–3 hr post invasion of human erythrocytes) after a 6 hr pulse of 700 nM DHA, as measured by microscopy 66 hr later. Data illustrate mean \pm SEM percent survival from three independent repeats compared with dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated parasites as a control for two isolates from French Guiana (O141-A, R086). Parents harbored wild-type *pfk13* allele, and for zinc-finger nuclease edited isogenic parasites, control (ctrl) isolates harbored wild-type *pfk13* allele with silent mutations or *pfk13* mutations (C580Y or R539T). IPC4912, a Cambodian reference strain harboring the I543T *pfk13* mutation was used as a control. A parasite line is considered resistant when the survival rate is greater than 1%. Student's t-test was used to assess significant differences between survival rates of parental and *pfk13*-edited parasites. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: not significant. The online version of this article includes the following source data for figure 4:

Source data 1. Survival rates obtained on *pfk13* gene-edited (wild-type, C580Y or R539T) isogenic field isolates from French Guiana.

coverage to assess their complexity of infection (COI), and only one (2.2%) showed evidence of multiple parasite lineages (COI > 1). In contrast, multiclonal infection estimates from Africa and Southeast Asia are routinely higher (Chang et al., 2017; Galinsky et al., 2015; Assefa et al., 2014; Zhu et al., 2019). Despite the low nucleotide diversity and small proportion of multiclonal infections, Guyana harbors a relatively high number of distinct parasite lineages and few parasite pairs with identical genomes. We found that only 0.54% of wild-type Guyanese parasite pairs showed evidence of belonging to the same clonal lineage (IBD > 0.75).

***pfk13* C580Y and R539T mutations generate *in vitro* artemisinin resistance in cultured parasites from the Amazonia**

To evaluate the impact of the *pfk13* C580Y mutation on artemisinin susceptibility in parasites, we culture-adapted two *P. falciparum* isolates (O141-A and R086) from French Guiana (a neighboring country in the Guiana Shield) and genetically edited these lines using a previously described zinc-finger nuclease (ZFN) based approach (Straimer et al., 2015). We also evaluated the impact of the

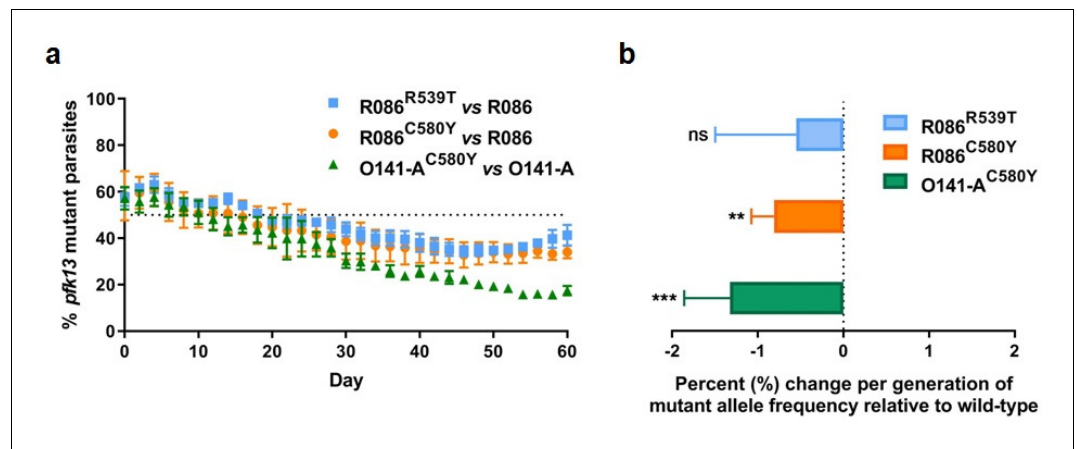


Figure 5. Competition growth assays of *pfk13* mutant and wild-type parasites. (a) Frequency of wild-type and mutant parasites in co-culture, as measured by TaqMan allelic discrimination qPCR. Data show the percentage of *pfk13* mutant parasites in the culture over 60 days with sampling every two days. Error bars represent the SEM of *pfk13* mutant allele frequency between the two biological replicates (including two technical replicates for qPCR). A percentage below 50% indicates the mutant was less fit than the isogenic *pfk13* wild-type line. (b) Percentage change per generation of *pfk13* mutant allele frequency relative to wild-type. Data show that *pfk13* mutations confer an *in vitro* fitness cost in both parasite lines. Differences in growth rates were calculated as the percent change in *pfk13* mutant allele frequency averaged over 30 generations. Error bars represent the SEM of percentage growth change between the two biological sampling experiments calculated for every generation in each co-culture. Significance was calculated using the Wilcoxon signed-rank test in every generation across the two biological replicate experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; ns: not significant.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 5:

Source data 1. Proportion of *pfk13* mutants compared to *pfk13* wild-type during 60 days of *in vitro* co-culture.

Figure supplement 1. Representative standard curves for qPCR reactions targeting *pfk13* C580Y/C580Y or *pfk13* R539T/R539T allele.

Figure supplement 1—source data 1. Data for establishment of standard curves and pre-defined set of mixtures of each *pfk13* allele (C580Y or R539T) used in the optimization of the Taqman allelic discrimination qPCR assays.

Figure supplement 2. Reproducibility of TaqMan allelic discrimination qPCR performed on R086^{R539T} and R086 parasites.

Figure supplement 2—source data 1. Data for the reproducibility of the Taqman allelic discrimination assay across qPCR repeats and sampling replicates performed with R086^{WT} vs R086^{R539T} parasites.

variant arginine to threonine mutation at codon 539 (R539T), associated with one of the highest *in vitro* artemisinin resistance levels in Asian parasites (Ariey *et al.*, 2014; Straimer *et al.*, 2015). These two culture-adapted lines both exhibit the *pfcr* SVMNT haplotype that is associated with chloroquine resistance, but only R086 carries the *pfcr* C350R mutation that was earlier found to restore chloroquine susceptibility to South American parasites despite the presence of the SVMNT haplotype (Pelleau *et al.*, 2015). These parasite lines from French Guiana exhibit a high level of genomic similarity to our genome-sequenced Guyanese parasites (Figures 2c and d; Figure 2—figure supplement 1). These findings suggest that phenotypes observed in these lines from French Guiana are relevant for understanding the impact of the *pfk13* C580Y variant in Guyanese parasites, none of which have yet been adapted to *in vitro* culture.

We produced isogenic lines expressing the wild-type *pfk13* allele (R086^{ctrl}, O141-A^{ctrl}) or the *pfk13* C580Y mutation (R086^{C580Y}, O141-A^{C580Y}), or the *pfk13* R539T allele in the case of R086 (R086^{R539T}). We measured the phenotypic impact of those mutations on *in vitro* artemisinin resistance in edited and parental lines using the Ring-stage Survival Assay (Witkowski *et al.*, 2013) that begins with 0–3 hr post-invasion rings (RSA_{0-3h}). Introducing the *pfk13* C580Y mutation caused a significant increase in the survival rate (twenty-three fold in R086: $0.6\% \pm 0.2$ for R086 to $13.7\% \pm 1.5$ for R086^{C580Y}, $p = 0.006$; fifty-five fold in O141-A: $0.5\% \pm 0.1$ for O141-A compared to $27.6\% \pm 7.0$ for O141-A^{C580Y}, $p = 0.030$, Figure 4, Figure 4—source data 1). R086^{R539T} showed a survival rate fifty-five times higher than the parental line ($33.0\% \pm 5.0$ compared to $0.6\% \pm 0.2$, $p = 0.011$). Control

assays found no significant difference in the survival rate of the parental vs. isogenic control lines ($0.6\% \pm 0.2$ for R086, $0.6\% \pm 0.4$ for R086^{ctrl}, $p=0.968$, $0.5\% \pm 0.1$ for O141-A and O141-A^{ctrl}, $p=0.899$) (Figure 4, Figure 4—source data 1).

***Pfk13* C580Y and R539T have a fitness impact on parasites depending on the genetic background**

To assess the *in vitro* fitness of the *pfk13* mutants relative to the wild-type isogenic lines, we performed a competitive growth assay by co-culturing each pair of mutant and wild-type isogenic parasite lines and measuring the *pfk13* allele frequencies over 60 days (~30 asexual generations). This was achieved using a highly sensitive and robust Taqman allelic discrimination real-time PCR (qPCR) assay (Figure 5—figure supplement 1, Figure 5—figure supplement 2, Figure 5—figure supplement 1—source data 1, Figure 5—figure supplement 2—source data 1) that was able to accurately quantify the different proportions of the mutant alleles in these samples. Results showed a modest growth deficit in *pfk13* mutants compared to the wild-type parent for both the R086 and O141-A lines, suggesting that the *pfk13* C580Y and R539T mutations negatively impact parasite growth. Over the 60 day period, we observed an 18% reduction in the frequency of the R539T mutant for the R086 line, and larger significant reductions of 24% and 40% in allele frequencies of the C580Y mutants of R086 and O141-A compared to their respective isogenic wild-type counterparts (Figure 5a, Figure 5—source data 1). This reflected an average reduced growth rate of -0.6% , -0.8% and -1.3% per 48 hr generation of the R086^{R539T}, R086^{C580Y} and O141-A^{C580Y} mutant lines, respectively, across 30 generations (Figure 5b, Figure 5—source data 1). In addition to observing that the C580Y mutation conferred a higher fitness cost compared to the R539T mutation, we also saw that the parasite genetic background contributed to the severity of the fitness deficit, as the growth defect in the C580Y mutation was substantially more pronounced in O141-A compared with R086 parasites (Figure 5, Figure 5—source data 1).

Discussion

Results presented herein confirm the *de novo* emergence and long-term persistence of the *pfk13* C580Y artemisinin resistance mutation in Guyana, South America. Six years after their first identification, *pfk13* C580Y mutant parasites continue to circulate in Guyana at low prevalence (1.6%; 14/854). Parasites bearing this mutation belong to a single clonal lineage and are of autochthonous origin. Gene editing studies on French Guianan parasites, closely related to parasites from Guyana, showed that the *pfk13* C580Y mutation is able to mediate artemisinin resistance *in vitro* at levels observed in Southeast Asian parasites harboring this mutation. An adverse impact of this *pfk13* mutation on asexual blood stage growth rates of *pfk13*-edited French Guianan parasite lines in culture was also observed, providing evidence of a fitness cost similar to that previously described for Southeast Asian lines (Nair et al., 2018; Li et al., 2019).

During the 1990s, analyses of resistant parasites retrospectively suggested the simultaneous emergence of resistance to chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine in parasites from Southeast Asia and the Amazonian region of South America (Wootton et al., 2002; Roper et al., 2004; Vinayak et al., 2010). With artemisinin, the same scenario is occurring with evidence of an independent emergence of resistance mutation in South America. For artemisinin resistance, there is an opportunity to dissect the first steps of resistance selection in South America in 'real time', relying on genetic markers and phenotypic assays (genotypic surveys, therapeutic efficacy studies, and *in vitro* phenotyping through the Ring-stage Survival Assay (RSA_{0-3h})) developed in Southeast Asia (Ariey et al., 2014; Witkowski et al., 2013). These genetic and phenotypic tools can help address the critical questions of why *in vitro* resistance to artemisinin has emerged in Region 1 in Guyana, a country with fewer than 20,000 malaria cases in 2018, and why this resistance is not increasing more quickly. In 2004, Guyana was one of the first South American malaria-endemic countries to adopt and implement artemether-lumefantrine (Coartem), the current first-line therapy against *P. falciparum*. Six years later, in 2010, *pfk13* C580Y mutants were first identified. Until now, no further signals of artemisinin resistance or *pfk13* mutations had been identified, despite studies incorporating *pfk13* genotyping in Guyana ($n = 50$), Suriname ($n = 40$) and French Guiana ($n = 198$) (Rahman et al., 2016; Ménard et al., 2016; Chenet et al., 2017). Other than *pfk13* C580Y, no other *pfk13* propeller domain mutations have been observed in Guyana. In Southeast Asia, two molecular epidemiological

profiles are currently observed. In Western Cambodia, one C580Y lineage (KEL1) has displaced other mutations and has rapidly become the dominant *pfk13* genotype in that population (>80%) (Amato et al., 2018; Takala-Harrison et al., 2015). This lineage has merged with a multicopy *plasmeprin 2* and 3 lineage (PLA1) that is associated with piperazine resistance (Amato et al., 2018). Nowadays, this co-lineage has colonized northeastern Thailand and southern Laos (Imwong et al., 2017). On the other side, in western Thailand, at the border with Myanmar, a six-year period was required for distinct mutant *pfk13* parasite lineages to collectively reach a population prevalence of 20% (Amato et al., 2018; Anderson et al., 2017). At the present time, a patchwork of *pfk13* genotypes co-circulates in that population and the prevalence of C580Y lineages fluctuates around 20–30% (Kobasa et al., 2018). In Myanmar, *pfk13* mutants are more diverse and the F446I mutation presently dominates the *pfk13* mutant parasite population in certain sites, with this mutation being associated with an intermediate resistance phenotype (Han et al., 2020; Bonnington et al., 2017).

Given this history of *pfk13* propeller domain mutations in Southeast Asia, beginning with a soft sweep and transitioning to a hard sweep, we might have expected an increase in the prevalence of *pfk13* C580Y mutant parasites during this 2010–2016/2017 period in Guyana. However, the situation in this part of the world differs from Southeast Asia. First, efforts to monitor *pfk13* mutations in Guyana were not systematically conducted between 2010 and 2017. Sample size could therefore explain why the C580Y mutation was only sporadically observed. Nonetheless, the present study indicates that the mutation has not drastically increased in the parasite population. Differences in the resistance profile to artemisinin partner drugs could also account for the heterogeneity in *pfk13* mutational trajectories in Southeast Asia vs. Guyana, a region where markers of resistance have historically reached fixation (Pelleau et al., 2015; Legrand et al., 2012). In Southeast Asia, the rapid spread of artemisinin-resistant genomic lineages can be explained in part by a multidrug-resistant profile, which includes *pfk13* variants as well as mutations conferring resistance to the partner drug piperazine (Amato et al., 2018; Ross et al., 2018; Kim et al., 2019). Our genomic analysis of a panel of Guyanese isolates identified the common South American profile for known drug resistance markers (*pfcr1*, *pfdhps*, *pfdhfr* and *pfmdr1*) in both mutant and wild-type *pfk13* samples (Wootton et al., 2002; Roper et al., 2004; Vinayak et al., 2010; Legrand et al., 2012). In the Guiana Shield, lumefantrine remains a highly effective partner drug for artemisinin, and no mutations or phenotypes associated with lumefantrine resistance have been observed (Legrand et al., 2012). High efficacy of the partner drug could therefore be an important factor limiting the spread of *pfk13* C580Y in Guyana. Finally, both the low synonymous pairwise genetic diversity ($\pi_{syn} = 3.4 \times 10^{-4}$) and the low complexity of infection (COI, 2.2% of samples with a COI > 1) in Guyana are in keeping with the expectation that the *P. falciparum* population in South America is smaller and more recently established than in Southeast Asia (Yalcindag et al., 2012).

The genomic structure of the Guyana parasite population could also help explain why the mutation arose there, rather than other settings in South America. The present findings indicate high out-crossing rates and few clonal lineages in Guyana (0.54% pairs with IBD >0.75). This clonal diversity is relatively high, especially within a South American context. Previous studies have found much higher proportions of non-unique haplotype backgrounds (>30% of samples) within parasite populations from Colombia (Echeverry et al., 2013), Peru (Dharia et al., 2010), and Ecuador (Sáenz et al., 2015; Sáenz et al., 2017). These prior analyses used fewer genomic markers, but the results still suggest that clonal diversity may be greater in the Guiana Shield relative to the rest of the continent, possibly driven by the high *P. falciparum* transmission level observed in mining areas (Douine et al., 2016; Ministry of Public Health, 2018). As genomic background likely plays a key role in the persistence of resistance mutations like C580Y, this haplotype richness may increase the likelihood that resistance mutations can successfully establish themselves in a permissive background. Subsequently, a low recombination rate may allow these beneficial combinations to then persist within the population. A more definitive exploration of this hypothesis, and of whether Guyana's current clonal structure represents recent demographic change or historic population subdivision, will be possible as more whole-genome sequence data become available for the continent. The slower trajectory of *pfk13* C580Y may also be due to an impaired asexual blood-stage growth rate, and the absence of compensatory mutations that have been hypothesized to aid the spread of the C580Y mutation in Southeast Asia (Amato et al., 2018; Li et al., 2019).

We chose to introduce two *pfk13* mutations by gene editing: C580Y mutation because of its presence in Guyana and its dominance in Southeast Asia, and R539T as a positive control for *in vitro*

resistance, as it exhibits the highest RSA observed in Southeast Asian strains along with I543T (Ariey *et al.*, 2014; Straimer *et al.*, 2015). Introducing these mutations conferred high levels of *in vitro* artemisinin resistance and both mutations negatively impacted growth rates *in vitro* in our parasite isolates from French Guiana, a neighboring country of Guyana. These growth rate differences provide a surrogate marker of fitness and do not necessarily predict *in vivo* success of the mutations, as multiple other parameters are also important including gametocyte production, impacts on transmission, and immunity. Our data show that the C580Y mutation was associated with a more severe growth defect compared to the R539T mutation in these asexual blood stage parasites. A similar finding was also recently reported in C580Y-edited isolates from the Thailand-Myanmar border (Nair *et al.*, 2018), although disparate results were obtained for C580Y-edited isolates from Cambodia (Straimer *et al.*, 2017). These contrasting data underline the influence of the parasite's genomic background, which potentially involves compensatory mutations that impact the overall growth. Further studies will be needed to screen for potential secondary mutations that may be offsetting these fitness costs. It will also be important to examine factors that could drive the persistence of mutant *pfk13* in Guyana despite the apparent fitness cost, including a consideration of local antimalarial drug usage and quality, transmission levels, and population movement.

The World Health Organization (WHO) has categorized countries regarding artemisinin resistance based on *pfk13* mutant prevalence and the clinical response to artemisinin derivatives (World Health Organization, 2017). The threshold of 5% of *pfk13* mutants has been met on several occasions in Guyana, first in 2010 (Chenet *et al.*, 2016), then punctually in 2016–2017 in Region 1. The situation is evolving and a marker could disappear for reasons that are currently unclear. Nonetheless, in light of these findings, Guyana has the status of suspected resistance to artemisinin derivatives (World Health Organization, 2017). The clinical and public health significance of the presence of these mutations on the therapeutic efficacy of artemisinin-based combination therapies in Guyana, and more precisely artemether/lumefantrine - first line in the country, should be directly evaluated. We note that our study had limitations including the small number of analyzed samples and the *in vitro* phenotypic impact evaluated in parasites from nearby French Guiana and not Guyana itself. Nonetheless, we observed that *pfk13* mutants still circulated in 2016–2017. Given their decreased susceptibility to DHA *in vitro*, these mutants are likely to expose the partner drug to the risk of emerging resistance. This situation could defeat *P. falciparum* elimination strategies in this region. Therefore, national health authorities should continue to work together in order to overcome difficulties coming from their multiplicity of regulations, malaria control strategies and transmission levels in the context of major human migrations across borders. The Guiana Shield initiative launched by the Pan American Health Organization (PAHO) and the WHO in 2016 will have a crucial role to reinforce and to coordinate the different malaria control measures.

Materials and methods

Sample collection

In collaboration with PAHO, 854 *P. falciparum* isolates were collected in Guyana from March 2016 to September 2017 in febrile individuals visiting the malaria clinic. Parasites associated with these samples came mainly from Region 1 ($n = 114$), 7 ($n = 572$) and 8 ($n = 150$) (Figure 1, Figure 1—source data 1). Those are the three main endemic regions for malaria in the country. Sample collection was done in patients who provided informed consent. As part of molecular surveillance established in the country, consent from the patients was not required and filter papers were collected at the diagnosis time in different clinics and hospital of the country.

DNA extraction and *pfk13* genotyping

DNA was extracted from dried blood spots using the QIAmp DNA mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Germany). The *pfk13* gene of each sample was amplified by nested PCR using published primers (Ariey *et al.*, 2014; Menard and Ariey, 2013). For the primary PCR, 1 μ l of DNA was amplified in a Mastermix containing: 1X of HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load (12.5 mM MgCl₂, Solis BioDyne), 3.5 mM MgCl₂, and 0.2 μ M of each primer to a final volume of 25 μ l. The amplification program was: 15 min at 95°C, then 35 cycles of 30 s at 95°C, 2 min at 60°C, 2 min at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C. For the nested PCR, 1 μ l of primary PCR

product was amplified under the same conditions with the following program: 15 min at 95°C, then 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C. Nested PCR products were detected using 2% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Double-strand sequencing was performed by Eurofins (France). Sequences were aligned with Geneious v8.1.7 using the 3D7 *pfk13* sequence as a reference. Mutant isolates were analyzed twice to confirm results.

***pfk13*-flanking microsatellite analysis**

The analysis of eight microsatellite loci located upstream (−31.9, −6.36, −3.74, −0.15 kb) and downstream (3.4, 8.6, 15.1, 72.3 kb) of the *pfk13* gene within isolates from Guyana was performed as previously described (Chenet *et al.*, 2016; Cheeseman *et al.*, 2012; Talundzic *et al.*, 2015).

Genetic modification of parasites at the positions 580 and 539 of the *pfk13* gene

Parasites were cultured in human red blood cells in enriched RPMI medium containing 10% human serum and were propagated at 37°C in 10% O₂, 5% CO₂ and 85% N₂. The enriched medium is composed of RPMI-1640 (ref 4130, Sigma Aldrich) with HEPES [25 mM], L-glutamine [5 mM], glucose [22 mM], NaHCO₃ 5% [25 mM], gentamycin [20 mM], hypoxanthine [0.37 mM] and orotic acid [1.6 μM]. Two *P. falciparum* isolates collected in French Guiana in 2011 (O141-A) and 2014 (R086) were genetically modified using the ZFN method as previously described (Straimer *et al.*, 2015). Briefly, donor plasmids (pZFN-K13-18/20-hDHFR-bsmut carrying the wild-type *pfk13* allele and pZFN-K13-18/20-hDHFR-C580Y and pZFN-K13-18/20-hDHFR-R539T carrying the mutated *pfk13* allele) were purified from XL10-Gold bacteria using the QIAGEN plasmid Maxi kit (ref12162) and resuspended in Cytomix. Parasites were electroporated with 50 μg of donor plasmid using the Biorad Gene-PulserII electroporator with settings of 0.31 kV and 950 μF (Fidock and Wellemis, 1997). The day after electroporation and for 6 days, parasites were exposed to 2.5 nM WR99210 (a gift from Jacobus Pharmaceuticals, Princeton, NJ). Between 20–35 days after electroporation, parasites were detectable by microscopy. To check plasmid integration into parasites, DNA was extracted from bulk culture with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) and was PCR amplified using primers p16 (5'-GCTAA TAAGTAATATCAATATAAGGG-3') and p17 (5'-GGTATTAATTTTTACCATTCCCATTAGTATTTTG TATAGG-3'). Sequencing was done by Eurofins with the p16 primer and sequences were analyzed using Geneious v8.1.7. Edited parasites were cloned by limiting dilution and selected after 3 weeks by lactate dehydrogenase assay using Malstat reagent (Goodyer and Taraschi, 1997; Adjalley *et al.*, 2010). Selected clones were *pfk13* genotyped.

In vitro drug sensitivity assays (ring-stage survival assay)

Parental and *pfk13*-edited parasites were phenotyped using the Ring-stage Survival Assay (RSA_{0-3h}) method as previously described (Witkowski *et al.*, 2013). RSA_{0-3h} were performed independently three times for each line. The *pfk13* I543T-mutant IPC4912 strain (MRA1241) was used as an artemisinin-resistant control. RSA_{0-3h} was interpretable if the initial parasitemia was greater than 0.25% and if the growth rate was greater than two-fold per 48 hr. Statistical significance between survival rates of the different lines were calculated using Student's t-test.

Competitive growth fitness assays

Fitness assays were performed by inoculating an equal number of wild-type and mutant isogenic ring-stage parasites in a 6 ml culture at an initial parasitemia of 1%. Each co-culture experiment was performed in duplicate on two independent occasions and monitored for 60 days. Saponin-lysed parasite pellets of each co-culture were harvested every two days during 60 days and genomic DNA was extracted using the QIAamp DNA mini kit. The percentage of wild-type or mutant allele in each co-culture was determined using genomic DNA in a TaqMan Allelic Discrimination Real-Time PCR Assays. Wilcoxon signed-rank test was applied to test for statistical significance in the observed percentage of the *pfk13* mutant allele in each of the individual paired co-cultures against an expected no change in the percentage of the mutant.

TaqMan allelic discrimination real-time PCR (qPCR) assays

Primers (forward and reverse) and TaqMan fluorescence-labeled MGB probes (Eurofins, Germany) for real-time quantitative PCR (qPCR) were designed to specifically detect the *pfk13* propeller mutations R539T and C580Y, or the ZFN silent binding mutations, in parasites. The sequences of the forward and reverse primers, and probes (FAM and HEX probe) are shown in **Supplementary file 4**. We first determined the efficiency and sensitivity of amplifying the *pfk13* allele in real-time PCR assays using standard curves comprising 10-fold serially diluted DNA templates ranging from 10 ng to 0.001 ng. Robustness was demonstrated by high efficiency (88–95%) and R^2 values (0.98–1.00) (**Figure 5—figure supplement 1a and b**, **Figure 5—figure supplement 1—source data 1**). Next, we tested the quantitative accuracy in genotype calling by performing multiplex qPCR assays using a pre-defined set of mixtures containing plasmids expressing wild-type to mutant alleles in fixed ratios (0:100, 20:80, 40:60, 50:50, 60:40, 80:20, 100:0). The triplicate points clustered tightly, indicating high reproducibility in the data across the fitted curve (linear polynomial order = 2, $R^2 = 0.92$ to 0.94) (**Figure 5—figure supplement 1c and d**, **Figure 5—figure supplement 1—source data 1**). Hence, our assay was able to accurately quantify the different proportions of the mutant alleles in these pre-mixed samples. For a single set of samples, we ran the qPCR on two separate occasions to test the consistency of amplification between runs. The results showed excellent correlations (**Figure 5—figure supplement 2a**, **Figure 5—figure supplement 2—source data 1**), and thus we concluded that it was not necessary to perform qPCR in replicate runs for each sample. Nevertheless, we always included three replicate qPCR reactions per sample in every run. The data showed consistently high correlations between independent sampling experiments (**Figure 5—figure supplement 2b**, **Figure 5—figure supplement 2—source data 1**).

Purified DNA templates were amplified with a species-specific primer set and the corresponding probe. Briefly, the qPCR reactions for every sample were run in triplicates consisting of 1x Quanti-FAST reaction mix containing ROX reference dye (Qiagen, Germany), 0.66 μ M of forward and reverse primers, 0.16 μ M each of the FAM-MGB and HEX-MGB TaqMan probes, and 10 ng of genomic DNA. Amplification and detection of fluorescence was carried out on the QuantStudio 3 (Applied Biosystems, USA) using the genotyping assay mode with the following cycling conditions: 30 s at 60°C, 5 min at 95°C to activate the enzyme, and 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 60°C and post-read out at 60°C for 30 s. The final optimized assays always included a positive control of plasmid expressing the mutant or wild-type allele in every PCR reaction to ensure the reaction was successful and a no template control of water as a negative control.

The software analyzed the background fluorescence level and calculated background normalized media dye fluorescence (ΔR_n) as a function of cycle number for the wild-type or mutant allele. To determine the wild-type or mutant allele frequency in each sample, we first confirmed the presence of the allele by only taking values where the C_t of sample was less than that of the no template control minus three cycles. Next, we subtracted the sample's ΔR_n from the background (control plasmid: absence of wild-type or mutant expressing allele) and normalized to 100% (control plasmid: 100% wild-type or mutant expressing allele) to obtain the percentage of mutant and wild-type allele. Then we calculated the average of (mutant and 100% - wild-type) to derive the percentage of mutant allele.

Whole-genome sequencing and variant calling

For the Guyana samples, we performed selective whole-genome amplification (SWGA) on DNA samples as previously described (**Oyola et al., 2016**) to enrich parasite DNA prior to sequencing on an Illumina HiSeqX instrument at the Broad Institute. We used the enriched DNA to construct Illumina sequencing libraries from the amplified material using the Nextera XT library kit (catalog no. FC-131–1002). We aligned reads to the *P. falciparum* v3 reference genome assembly using BWA-MEM (**Li, 2013**) and called SNPs and INDELS using the GATK HaplotypeCaller (**Van der Auwera et al., 2013; McKenna et al., 2010; DePristo et al., 2011**) according to the best practices for *P. falciparum* as determined by the Pf3K consortium (<https://www.malariagen.net/projects/pf3k>). Analyses were limited to the callable segments of the genome (**Miles et al., 2016**) and excluded sites where over 20% of samples were heterozygous. Additional BAM files for comparative analyses among populations were downloaded from the Pf3k project (release 5; www.malariagen.net/projects/pf3k). For each of four countries in Africa (Democratic Republic of Congo, Ghana, Guinea, and Malawi) and

two countries in Southeast Asia (Cambodia and Thailand), 50 samples were chosen based on their high coverage (greatest number of sites with at least 10 × coverage).

Genomic analysis

We calculated pairwise identity by descent (IBD) using a hidden Markov model (hmmIBD) (Schaffner *et al.*, 2018). Samples with a missing call rate >0.7 were excluded from the analysis. We conducted PCA analyses using R (R Development Core Team, 2016) after removing samples that showed high relatedness (IBD >0.5) to another sample with higher sequencing coverage. Pairwise nucleotide diversity was calculated using a custom Perl script (Source Code File 1, Source Code File 2, Source Code File 3). All genomic analyses were limited to samples containing only a single clonal lineage, as determined by THE REAL McCOIL (Chang *et al.*, 2017) or as identified by the Pf3K consortium (Zhu *et al.*, 2019).

Acknowledgements

LM gratefully acknowledges funding support from Global Malaria Program (World Health Organization), French Ministry for research, European Commission Grant (Regional fund for Development, Synergie GY0012082), Santé Publique France as National Reference Center for Malaria and Investissement d'Avenir grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref ANR-10-LABX-25-01). DAF gratefully acknowledges funding support from the NIH (R01 AI109023; R01 124678 and R37 AI50234) and the Bill and Melinda Gates Foundation (OPP1201387). DEN and AME have been funded in part with Federal funds from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, under Grant Number U19AI110818 to the Broad Institute. SM receives support from a Human Frontiers Science Program Long-Term Fellowship. We thank Leila Ross and Barbara Stokes for their help with *in vitro* fitness assays.

Additional information

Competing interests

Maria-Paz Ade, Jean SF Alexandre, Pascal Ringwald: MPA, JSFA, and PR are staff members of the World Health Organization. The authors alone are responsible for the views expressed in this publication and they do not necessarily represent the decisions, policy or views of the World Health Organization. The other authors declare that no competing interests exist.

Funding

Funder	Grant reference number	Author
European Commission	Synergie GY0012082	Luana C Mathieu
Sante Publique France	NRC for malaria	Yassamine Lazrek Lise Musset
Agence Nationale de la Recherche	ANR-10-LABX-25-01	Lise Musset
Human Frontier Science Program	Long-Term Fellowship	Sachel Mok
Bill and Melinda Gates Foundation	OPP1201387	David Fidock
National Institutes of Health	R01 AI109023	David Fidock
National Institute of Allergy and Infectious Diseases	U19AI110818	Angela M Early Daniel E Neafsey
World Health Organization	Global Malaria Program	Lise Musset
National Institutes of Health	R01 124678	David Fidock
National Institutes of Health	R37 AI50234	David Fidock

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Luana C Mathieu, Sachel Mok, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Validation, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review and editing; Horace Cox, Conceptualization, Resources, Methodology, Project administration, Writing - review and editing, Coordinate sample collection; Angela M Early, Conceptualization, Software, Formal analysis, Validation, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review and editing; Yassamine Lazrek, Supervision, Investigation, Project administration; Jeanne-Celeste Paquet, Data curation, Investigation; Maria-Paz Ade, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Writing - review and editing, Coordinate sample collection; Naomi W Lucchi, Data curation, Investigation, Methodology, Writing - review and editing; Quacy Grant, Conceptualization, Supervision, Project administration; Venkatachalam Udhayakumar, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation, Methodology; Jean SF Alexandre, Resources, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Coordinate sample collection; Magalie Demar, Supervision, Project administration; Pascal Ringwald, Conceptualization, Resources, Formal analysis, Supervision, Validation, Project administration, Writing - review and editing; Daniel E Neafsey, Conceptualization, Resources, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing - review and editing; David A Fidock, Conceptualization, Resources, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing - review and editing; Lise Musset, Conceptualization, Resources, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Project administration, Writing - review and editing

Author ORCIDs

Luana C Mathieu  <https://orcid.org/0000-0002-6021-468X>

Sachel Mok  <https://orcid.org/0000-0002-9605-0154>

Jeanne-Celeste Paquet  <https://orcid.org/0000-0001-6046-0154>

Daniel E Neafsey  <https://orcid.org/0000-0002-1665-9323>

David A Fidock  <https://orcid.org/0000-0001-6753-8938>

Lise Musset  <https://orcid.org/0000-0003-0215-4110>

Ethics

Human subjects: The samples were collected as part of the routine surveillance system implemented in Guyana. Health care facilities were in charge of collecting anonymized *P. falciparum* positive cases. Identification of individuals cannot be established. In accordance with WHO guidelines on ethical issues in public health surveillance the sample collection in Guyana was exempt of ERC since this intervention was part of the Malaria control program defined by the Ministry of Public Health of the country as monitoring of public health programs (<https://www.who.int/ethics/publications/public-health-surveillance/en/>). The analysis of the samples was also approved by the Environmental Protection Agency in the frame on the Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization.

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.51015.sa1>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.51015.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Source code 1. Source code to calculate the nucleotide diversity per nucleotide.

- Source code 2. Source code to calculate the nucleotide diversity per genomic region.
- Source code 3. Example of input file to do calculations.
- Supplementary file 1. Resistance genotype profiles of parasites from Guyana and French Guiana.
- Supplementary file 2. Guyana SWGA associated markers.
- Supplementary file 3. Comparison of synonymous nucleotide diversity per country.
- Supplementary file 4. List of the sets of forward and reverse primers and dual fluorescent-labeled FAM/HEX MGB probes used.
- Transparent reporting form

Data availability

The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information. Whole genome sequencing data from this study are available from the NCBI Sequence Read Archive under BioProject ID PRJNA543530. Genome data from the Pf3K project are available at <https://www.malariagen.net/projects/pf3k>.

The following dataset was generated:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Early A, Mathieu L, Cox H, Musset L, Neafsey DE	2018	Whole Genome Sequencing of <i>P. falciparum</i> collected in Guyana, 2016-2017	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA543530	NCBI BioProject, PRJNA543530

The following previously published dataset was used:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Kwiatkowski DP	2019	MALARIAGEN: Malaria Genomic Epidemiology Network	https://www.malariagen.net/projects/pf3k	Malaria Gen, Pf3k version 6

References

- Adjalley SH**, Lee MC, Fidock DA. 2010. A method for rapid genetic integration into *Plasmodium falciparum* utilizing mycobacteriophage Bxb1 integrase. *Methods in Molecular Biology* **634**:87–100. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-652-8_6, PMID: 20676977
- Amato R**, Pearson RD, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Drury E, Stalker J, Miotto O, Fairhurst RM, Kwiatkowski DP. 2018. Origins of the current outbreak of multidrug-resistant malaria in Southeast Asia: a retrospective genetic study. *The Lancet Infectious Diseases* **18**:337–345. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30068-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30068-9), PMID: 29398391
- Anderson TJ**, Nair S, McDew-White M, Cheeseman IH, Nkhoma S, Bilgic F, McGready R, Ashley E, Pyae Phyo A, White NJ, Nosten F. 2017. Population parameters underlying an ongoing soft sweep in southeast asian malaria parasites. *Molecular Biology and Evolution* **34**:131–144. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw228>, PMID: 28025270
- Ariey F**, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Ménard S, Rogers WO, Genton B, et al. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **505**:50–55. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12876>
- Ashley EA**, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runchaoen R, et al. 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine* **371**:411–423. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314981>, PMID: 25075834

- Assefa SA**, Preston MD, Campino S, Ocholla H, Sutherland CJ, Clark TG. 2014. estMOI: estimating multiplicity of infection using parasite deep sequencing data. *Bioinformatics* **30**:1292–1294. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu005>, PMID: 24443379
- Bhatt S**, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle K, Moyes CL, Henry A, Eckhoff PA, Wenger EA, Briët O, Penny MA, Smith TA, Bennett A, Yukich J, Eisele TP, Griffin JT, Fergus CA, Lynch M, et al. 2015. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**: 207–211. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature15535>, PMID: 26375008
- Bonnington CA**, Phyo AP, Ashley EA, Imwong M, Sriprawat K, Parker DM, Proux S, White NJ, Nosten F. 2017. *Plasmodium falciparum* kelch 13 mutations and treatment response in patients in Hpa-Pun district, northern kayin state, Myanmar. *Malaria Journal* **16**:480. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2128-x>, PMID: 29178921
- Carrara VI**, Sirilak S, Thonglairuam J, Rojanawatsirivet C, Proux S, Gilbos V, Brockman A, Ashley EA, McGready R, Krudsood S, Leemingsawat S, Looareesuwan S, Singhasivanon P, White N, Nosten F. 2006. Deployment of early diagnosis and mefloquine- Artesunate treatment of falciparum malaria in Thailand: the tak malaria initiative. *PLOS Medicine* **3**:e183. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030183>
- Cerqueira GC**, Cheeseman IH, Schaffner SF, Nair S, McDew-White M, Phyo AP, Ashley EA, Melnikov A, Rogov P, Birren BW, Nosten F, Anderson TJC, Neafsey DE. 2017. Longitudinal genomic surveillance of *Plasmodium falciparum* malaria parasites reveals complex genomic architecture of emerging artemisinin resistance. *Genome Biology* **18**:78. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1204-4>, PMID: 28454557
- Chang HH**, Worby CJ, Yeka A, Nankabirwa J, Kanya MR, Staedke SG, Dorsey G, Murphy M, Neafsey DE, Jeffreys AE, Hubbart C, Rockett KA, Amato R, Kwiatkowski DP, Buckee CO, Greenhouse B. 2017. THE REAL McCOIL: a method for the concurrent estimation of the complexity of infection and SNP allele frequency for malaria parasites. *PLOS Computational Biology* **13**:e1005348. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005348>, PMID: 28125584
- Cheeseman IH**, Miller BA, Nair S, Nkhoma S, Tan A, Tan JC, Al Saai S, Phyo AP, Moo CL, Lwin KM, McGready R, Ashley EA, Imwong M, Stepniewska K, Yi P, Dondorp AM, Mayxay M, Newton PN, White NJ, Nosten F, et al. 2012. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science* **336**:79–82. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1215966>, PMID: 22491853
- Chenet SM**, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, Krishnalal K, Ceron N, Musset L, Macedo de Oliveira A, Venkatesan M, Rahman R, Barnwell JW, Udhayakumar V. 2016. Independent Emergence of the *Plasmodium falciparum* Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana. *Journal of Infectious Diseases* **213**:1472–1475. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv752>
- Chenet SM**, Okoth SA, Kelley J, Lucchi N, Huber CS, Vreden S, Macedo de Oliveira A, Barnwell JW, Udhayakumar V, Adhin MR. 2017. Molecular profile of malaria drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Suriname. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**:e02655. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02655-16>
- DePristo MA**, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernytsky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ. 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics* **43**:491–498. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.806>, PMID: 21478889
- Dharia NV**, Plouffe D, Bopp SE, González-Páez GE, Lucas C, Salas C, Soberon V, Bursulaya B, Kochel TJ, Bacon DJ, Winzeler EA. 2010. Genome scanning of amazonian *Plasmodium falciparum* shows subtelomeric instability and clindamycin-resistant parasites. *Genome Research* **20**:1534–1544. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.105163.110>, PMID: 20829224
- Dondorp AM**, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, et al. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine* **361**: 455–467. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808859>, PMID: 19641202
- Douine M**, Musset L, Corlin F, Pelleau S, Pasquier J, Mutricy L, Adenis A, Djossou F, Brousse P, Perotti F, Hiwat H, Vreden S, Demar M, Nacher M. 2016. Prevalence of *plasmodium spp.* in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. *Malaria Journal* **15**:315. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1367-6>, PMID: 27277831
- Douine M**, Lazrek Y, Blanchet D, Pelleau S, Chanlin R, Corlin F, Hureau L, Volney B, Hiwat H, Vreden S, Djossou F, Demar M, Nacher M, Musset L. 2018. Predictors of antimalarial self-medication in illegal gold miners in french guiana: a pathway towards artemisinin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **73**:231–239. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx343>, PMID: 29045645
- Eastman RT**, Fidock DA. 2009. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nature Reviews Microbiology* **7**:864–874. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2239>, PMID: 19881520
- Echeverry DF**, Nair S, Osorio L, Menon S, Murillo C, Anderson TJ. 2013. Long term persistence of clonal malaria parasite *Plasmodium falciparum* lineages in the Colombian Pacific region. *BMC Genetics* **14**:2. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-2>, PMID: 23294725
- Fidock DA**, Wellems TE. 1997. Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *PNAS* **94**:10931–10936. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10931>, PMID: 9380737
- Galinsky K**, Valim C, Salmier A, de Thoisy B, Musset L, Legrand E, Faust A, Baniecki ML, Ndiaye D, Daniels RF, Hartl DL, Sabeti PC, Wirth DF, Volkman SK, Neafsey DE. 2015. COIL: a methodology for evaluating malarial

- complexity of infection using likelihood from single nucleotide polymorphism data. *Malaria Journal* **14**:4. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-14-4>, PMID: 25599890
- Goodyer ID**, Taraschi TF. 1997. *Plasmodium falciparum*: a simple, rapid method for detecting parasite clones in microtiter plates. *Experimental Parasitology* **86**:158–160. DOI: <https://doi.org/10.1006/expr.1997.4156>, PMID: 9207746
- Han KT**, Lin K, Myint MK, Thi A, Aye KH, Han ZY, Moe M, Bustos MD, Rahman MM, Ringwald P, Simmons R, Markwalter CF, Plowe CV, Nyunt MM. 2020. Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine retain high efficacy for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Myanmar. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **102**:598–604. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0692>, PMID: 31833468
- Heemskerck**. 2011. *Small-scale gold mining in the transboundary areas of Brazil, Suriname and French Guiana. Social and Environmental Issues. Report Paramaribo, Suriname*:: United Nations Development Programme.
- Imwong M**, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, Smithuis FM, Hlaing TM, Tun KM, van der Pluijm RW, Tripura R, Miotto O, Menard D, Dhorda M, Day NPJ, White NJ, Dondorp AM. 2017. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *The Lancet Infectious Diseases* **17**:491–497. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30048-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30048-8)
- Kim J**, Tan YZ, Wicht KJ, Erramilli SK, Dhingra SK, Okombo J, Vendome J, Hagenah LM, Giacometti SI, Warren AL, Nosol K, Roepe PD, Potter CS, Carragher B, Kosiakoff AA, Quick M, Fidock DA, Mancina F. 2019. Structure and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT. *Nature* **576**:315–320. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1795-x>, PMID: 31776516
- Kobasa T**, Talundzic E, Sug-aram R, Boondat P, Goldman IF, Lucchi NW, Dharmarak P, Sintasath D, Fukuda M, Whistler T, MacArthur J, Udhayakumar V, Prempee P, Chinanonwait N. 2018. Emergence and Spread of kelch13 Mutations Associated with Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Parasites in 12 Thai Provinces from 2007 to 2016. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **62**:e02141. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02141-17>
- Legrand E**, Yrinesi J, Ekala M-T, Péneau J, Volney B, Berger F, Bouchier C, Bertani S, Musset L, Meynard J-B, Mercereau-Puijalon O. 2012. Discordant Temporal Evolution of PfCRT and PfmD1 Genotypes and *Plasmodium falciparum* in vitro drug susceptibility to 4-aminoquinolines after drug policy change in French Guiana. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**:1382–1389. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.05280-11>
- Li H**. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv*. <https://arxiv.org/abs/1303.3997>.
- Li X**, Kumar S, McDew-White M, Haile M, Cheeseman IH, Emrich S, Button-Simons K, Nosten F, Kappe SHI, Ferdig MT, Anderson TJC, Vaughan AM. 2019. Genetic mapping of fitness determinants across the malaria parasite *Plasmodium falciparum* life cycle. *PLOS Genetics* **15**:e1008453. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008453>, PMID: 31609965
- McKenna A**, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. 2010. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* **20**:1297–1303. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>, PMID: 20644199
- Ménard D**, Khim N, Beghain J, Adegnikaa AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, Rahim-Awab G, Barnadas C, Berry A, Boum Y, Bustos MD, Cao J, Chen JH, Collet L, Cui L, Thakur GD, Dieye A, Djallé D, Dorkenoo MA, Eboumbou-Moukoko CE, et al. 2016. A worldwide map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *The New England Journal of Medicine* **374**:2453–2464. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513137>, PMID: 27332904
- Menard D**, Ariey F. 2013. *PCR-Sequencing for Genotyping SNPs PF3D7_1343700 Kelch Protein Propeller Domain*: Institut Pasteur du Cambodge – Institut Pasteur, Paris Procedure.
- Miles A**, Iqbal Z, Vauterin P, Pearson R, Campino S, Theron M, Gould K, Mead D, Drury E, O'Brien J, Ruano Rubio V, MacInnis B, Mwangi J, Samarakoon U, Ranford-Cartwright L, Ferdig M, Hayton K, Su XZ, Wellems T, Rayner J, et al. 2016. Indels, structural variation, and recombination drive genomic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Genome Research* **26**:1288–1299. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.203711.115>, PMID: 27531718
- Ministry of Public Health**. 2018. National malaria programme strategic plan 2015-2020. <http://docs.bvslud.org/biblioref/2018/07/906525/arbo-guy-005.pdf> [Accessed April 30, 2019].
- Miotto O**, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Duong S, Nguon C, Chuor CM, Saunders D, Se Y, Lon C, Fukuda MM, Amenga-Etego L, Hodgson AV, et al. 2013. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nature Genetics* **45**:648–655. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2624>, PMID: 23624527
- Miotto O**, Amato R, Ashley EA, MacInnis B, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, Lim P, Mead D, Oyola SO, Dhorda M, Imwong M, Woodrow C, Manske M, Stalker J, Drury E, Campino S, Amenga-Etego L, Thanh TN, Tran HT, Ringwald P, et al. 2015. Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nature Genetics* **47**:226–234. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.3189>, PMID: 25599401
- Nair S**, Li X, Arya GA, McDew-White M, Ferrari M, Nosten F, Anderson TJC. 2018. Fitness Costs and the Rapid Spread of kelch13 -C580Y Substitutions Conferring Artemisinin Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **62**:e00605. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00605-18>
- Oyola SO**, Ariani CV, Hamilton WL, Kekre M, Amenga-Etego LN, Ghansah A, Rutledge GG, Redmond S, Manske M, Jyothi D, Jacob CG, Otto TD, Rockett K, Newbold CI, Berriman M, Kwiatkowski DP. 2016. Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification. *Malaria Journal* **15**:597. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1641-7>, PMID: 27998271

- Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkman SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA, Neafsey DE, Musset L. 2015. Adaptive evolution of malaria parasites in french guiana: reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfcr*. *PNAS* **112**:11672–11677. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1507142112>, PMID: 26261345
- Pribluda VS, Evans L, Barillas E, Marmion J, Lukulay P, Chang J. 2014. Were medicine quality and pharmaceutical management contributing factors in diminishing artemisinin efficacy in Guyana and Suriname? *Malaria Journal* **13**:77. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-77>, PMID: 24581434
- R Development Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rahman R, Martin MJ, Persaud S, Ceron N, Kellman D, Musset L, Carter KH, Ringwald P. 2016. Continued sensitivity of *Plasmodium falciparum* to Artemisinin in Guyana, With Absence of Kelch Propeller Domain Mutant Alleles. *Open Forum Infectious Diseases* **3**:ofw185. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw185>, PMID: 27704030
- Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T. 2004. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science* **305**:1124. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1098876>, PMID: 15326348
- Ross LS, Dhingra SK, Mok S, Yeo T, Wicht KJ, Kumpornsin K, Takala-Harrison S, Witkowski B, Fairhurst RM, Ariey F, Menard D, Fidock DA. 2018. Emerging southeast asian PFCRT mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line antimalarial piperazine. *Nature Communications* **9**:3314. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05652-0>, PMID: 30115924
- Sáenz FE, Morton LC, Okoth SA, Valenzuela G, Vera-Arias CA, Vélez-Álvarez E, Lucchi NW, Castro LE, Udhayakumar V. 2015. Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. *Malaria Journal* **13** Suppl 1:497. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-015-1019-2>, PMID: 26651993
- Sáenz FE, Arévalo-Cortés A, Valenzuela G, Vallejo AF, Castellanos A, Poveda-Loayza AC, Gutierrez JB, Alvarez A, Yan YH, Benavides Y, Castro LE, Arévalo-Herrera M, Herrera S. 2017. Malaria epidemiology in low-endemicity Areas of the northern coast of Ecuador: high prevalence of asymptomatic infections. *Malaria Journal* **16**:300. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1947-0>, PMID: 28747199
- Schaffner SF, Taylor AR, Wong W, Wirth DF, Neafsey DE. 2018. hmlBD: software to infer pairwise identity by descent between haploid genotypes. *Malaria Journal* **17**:196. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2349-7>, PMID: 29764422
- Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, Dacheux M, Khim N, Zhang L, Lam S, Gregory PD, Urnov FD, Mercereau-Puijalon O, Benoit-Vical F, Fairhurst RM, Ménard D, Fidock DA. 2015. Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* **347**:428–431. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1260867>, PMID: 25502314
- Straimer J, Gnädig NF, Stokes BH, Ehrenberger M, Crane AA, Fidock DA. 2017. *Plasmodium falciparum* K13 mutations differentially impact ozone susceptibility and parasite fitness *In Vitro*. *mBio* **8**:e00172. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00172-17>, PMID: 28400526
- Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, Cummings MP, Silva JC, Dondorp AM, Fukuda MM, Hien TT, Mayxay M, Noedl H, Nosten F, Kyaw MP, Nhien NT, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Ariey F, et al. 2015. Independent emergence of artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. *The Journal of Infectious Diseases* **211**:670–679. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu491>, PMID: 25180241
- Talundzic E, Chenet SM, Goldman IF, Patel DS, Nelson JA, Plucinski MM, Barnwell JW, Udhayakumar V. 2015. Genetic analysis and species specific amplification of the artemisinin Resistance-Associated Kelch propeller domain in *P. falciparum* and *P. vivax*. *PLOS ONE* **10**:e0136099. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136099>, PMID: 26292024
- Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella KV, Altshuler D, Gabriel S, DePristo MA. 2013. From FastQ data to high confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* **43**:33. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43>
- Vinayak S, Alam MT, Mixson-Hayden T, McCollum AM, Sem R, Shah NK, Lim P, Muth S, Rogers WO, Fandeur T, Barnwell JW, Escalante AA, Wongsrichanalai C, Ariey F, Meshnick SR, Udhayakumar V. 2010. Origin and evolution of sulfadoxine resistant *Plasmodium falciparum*. *PLOS Pathogens* **6**:e1000830. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000830>, PMID: 20360965
- Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, Lim P, Mao S, Sopha C, Sam B, Anderson JM, Duong S, Chuor CM, Taylor WRJ, Suon S, Mercereau-Puijalon O, Fairhurst RM, Menard D. 2013. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in-vitro* and *ex-vivo* drug-response studies. *The Lancet Infectious Diseases* **13**:1043–1049. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70252-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70252-4)
- Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ. 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **418**:320–323. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature00813>, PMID: 12124623
- World Health Organization. 2001. Antimalarial drug combination therapy. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66952/1/WHO_CDS_RBM_2001.35.pdf [Accessed April 11, 2017].
- World Health Organization. 2017. Status report on artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance. . <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255213/1/WHO-HTM-GMP-2017.9-eng.pdf?ua=1> [Accessed February 27, 2018].

- World Health Organization.** 2018. Status report on artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274362/WHO-CDS-GMP-2018.18-eng.pdf?ua=1> [Accessed September 14, 2018].
- World Health Organization.** 2019. World Malaria Report. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/world-malaria-report-2019> [Accessed January 7, 2020].
- WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group.** 2019. Association of mutations in the *Plasmodium falciparum* Kelch13 gene (Pf3D7_1343700) with parasite clearance rates after artemisinin-based treatments—a WWARN individual patient data meta-analysis. *BMC Medicine* **17**:1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1207-3>, PMID: 30651111
- Yalcindag E,** Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson TJ, Aubouy A, Balloux F, Besnard P, Bogreau H, Carnevale P, D'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Jombart T, Le Mire J, Leroy E, Maestre A, Mayxay M, Ménard D, et al. 2012. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *PNAS* **109**:511–516. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1119058109>, PMID: 22203975
- Zhu SJ,** Hendry JA, Almagro-Garcia J, Pearson RD, Amato R, Miles A, Weiss DJ, Lucas TC, Nguyen M, Gething PW, Kwiatkowski D, McVean G, Pf3k Project. 2019. The origins and relatedness structure of mixed infections vary with local prevalence of *P. falciparum* malaria. *eLife* **8**:e40845. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.40845>, PMID: 31298657

Parallel Evolution of Adaptive Mutations in *Plasmodium falciparum* Mitochondrial DNA During Atovaquone-Proguanil Treatment

Lise Musset,*† Jacques Le Bras,*† and Jérôme Clain*

*Université Paris Descartes, IFR71 Sciences du Médicament, EA209-Eucaryotes pathogènes: Transports membranaires et Chimiorésistances, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France; and †Centre National de Référence du Paludisme, APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

Here we provide direct evidence that two adaptive nucleotide changes in the same codon (268) of the cytochrome *b* gene (*pfcytb*) each occurred repeatedly in independent *Plasmodium falciparum* lineages exposed to the antimalarial drug atovaquone-proguanil (AP). We analyzed the history of 7 AP resistance alleles from clinical isolates by sequencing the mitochondrial (mt) genome that encodes the *pfcytb* gene and found that a distinct mt haplotype was associated with each AP resistance allele. By comparing mt sequences and microsatellite genotypes of the isolates both before treatment initiation and at the day of failure for each uncured patient, we observed that the AP resistance alleles occurred and spread within the patients. These data demonstrate that identical AP resistance alleles have multiple independent origins and provide an example of parallel evolution driven by drug treatment selection in *P. falciparum*.

Introduction

In the classical model of molecular adaptation, a beneficial allele enters a population following a unique mutational event and then increases in frequency under directional selection. In parallel evolution, the same adaptive change at the same site occurs repeatedly in independent lineages exposed to the same selection pressures (Wichman et al. 2000). Whereas parallel evolution can be easily detected in experimental replicates by survey of DNA sequences during the experiment (Cunningham et al. 1997; Wichman et al. 2000), its detection in nature is more difficult because it mostly relies on phylogenetic inferences (Zhang and Kumar 1997; Colosimo et al., 2005). Evolution of microbial populations under strong selection provides a useful model for analyzing parallel adaptation, because population sizes are large and generation times are short (Boucher et al. 1992; Wichman et al. 1999).

Here we provide direct evidence that two adaptive nucleotide changes in the cytochrome *b* gene of *Plasmodium falciparum* (*pfcytb*) each occurred repeatedly in independent natural lineages exposed to the antimalarial drug atovaquone-proguanil (AP). Resistance of *P. falciparum* to atovaquone is conferred by single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *pfcytb* gene located on the 6-kb mitochondrial (mt) genome (Korsinczky et al., 2000; Kessl et al. 2005). Once atovaquone resistance is present, the synergy of the partner drug proguanil is markedly reduced (Fivelman, Adagu, and Warhurst 2004) and can lead to treatment failure (Musset et al. 2006).

To address the evolutionary origins of AP resistance (APR) alleles, we analyzed sequence variation of the mt genome within 7 resistant isolates (6 African and 1 Thai) collected at the day of atovaquone ($n = 1$) or AP ($n = 6$) treatment failure (Dfail isolates; Supplementary Material Online). All the Dfail isolates carried either the a4296g ($n = 2$) or the a4296c ($n = 5$) SNP associated with APR, replacing tyrosine 268 with a cysteine (Y268C) or a serine (Y268S), respectively, in the *pfcytb* gene, (Musset

et al. 2006). For each Dfail isolate, a distinct mt haplotype could be defined with 11 variable sites, including the position 4296 (fig. 1). As a control, 28 pretreatment isolates from patients successfully cured by AP (D0^{control} isolates) were selected to match the year and the African country of origin of the Dfail isolates. All carried the wild type *pfcytb* allele. Two susceptible mt haplotypes, S1 and S2, largely predominated and 6 haplotypes were found only once, a pattern of mt genetic diversity consistent with a previous study (Joy et al. 2003). The mean number of pairwise nucleotide differences at 5,819 aligned nucleotide sites was similar between the D0^{control} and the Dfail isolate groups (2.43 ± 0.99 SE and 2.57 ± 0.88 SE). These data do not support the hypothesis of a recent single origin, where all the APR mt sequences would be expected to be nearly identical. Rather, the distribution of resistant haplotypes in the median-joining network suggests multiple independent origins of the selected APR alleles (fig. 2).

D0 parasites isolated before treatment were available for 6 of the 7 failure cases. Remarkably, the APR allele was not detected in any of the D0 corresponding isolates (Musset et al. 2006), even using a sensitive assay that detects one APR allele in the presence of up to 10^3 copies of the wild type susceptible allele (fig. S1 in supplementary data). This indicates that the APR allele was either absent or at a very low frequency in isolates before treatment onset. We then investigated the genetic diversity within each pair of D0 and Dfail isolates from the 6 patients. Remarkably, with the exception of the polymorphisms at the 4296 site associated with APR, the mt genetic pattern was identical within each pair of isolates (except for patient 2, for which we failed to amplify part of the D0 mt genome; fig. 3). Identical genetic patterns were also observed at 5 polymorphic nuclear microsatellite *loci* within pairs for 4 patients (fig. 3), indicating genetically identical infections before and after treatment. For the 2 remaining patients, several coinfecting alleles were detected at more than 1 *locus* in D0 isolates. When only predominant alleles were scored, genetic identity was observed. Because each of the 5 African D0 haplotypes was unique (defined by the mt genome and the 5 microsatellite *loci*) among D0^{control} isolates sample (fig. S2 in supplementary data), it is exceedingly unlikely that, in 5 independent patients, a susceptible and a resistant allele that share an identical haplotype were transmitted by chance to the same host. Taken together, the data presented

Key words: *Plasmodium falciparum*, atovaquone-proguanil resistance, cytochrome *b*, parallel evolution.

E-mail: jerome.clain@univ-paris5.fr

Mol. Biol. Evol. 24(8):1582–1585. 2007

doi:10.1093/molbev/msm087

Advance Access publication May 7, 2007

		Mitochondrial genome nucleotide position ^c																				
		<i>cox3</i>					<i>cox1</i>			<i>cytb</i>												
		6	7	7	8	8	1	1	1	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4	5		
		8	1	1	6	9	6	0	9	7	1	4	6	1	9	8	5	2	8	5	5	
		4	0	1	9	1	5	9	4	8	3	9	7	9	6	9	2	4	0	4	4	
		r	r	r	n	n	s	r	i	i	i	s	s	s	n	n	s	s	i	i	r	
Haplotype ^a	Origin ^b	n	A	-	-	G	T	G	A	G	T	C	C	C	A	A	G	C	A	G	C	-
R1	IVC	1	G
R2	IVC	1	.	.	.	T	.	.	T	C	T	T	.
R3	UPV	1	T	.	C
R4	UPV	1	G	A
R5	UPV	1	C
R6	GUI	1	A	.	T	C	.	G
R7	THA	1	C	C
S1	IVC/UPV/GUI	13
S2	IVC/UPV/GUI	9	A
S3	IVC	1	C	T
S4	UPV	1	.	.	.	C	.	.	A
S5	UPV	1	A	.	.	T	.	.	.	T
S6	GUI	1	A	T	.	.	.
S7	GUI	1	.	A	T	.	.	.	A
S8	GUI	1	G	-	-	T

FIG. 1.—Mitochondrial genetic diversity within atovaquone-proguanil (AP) resistant and susceptible *P. falciparum* isolates. ^a R and S: haplotypes carried by Dfail AP resistant and D0^{control} AP susceptible isolates, respectively. ^b IVC: Côte d’Ivoire, UPV: Burkina Faso, GUI: Guinea, THA: Thailand. ^c Only variable nucleotide positions are shown. Grey shading indicates the 3 mitochondrial coding sequences: *cox3*, *cox1* and *cytb*. s: synonymous coding, n: nonsynonymous coding, r: variation in rRNA sequences, i: intergenic. The sequence at the top is derived from accession no. AY282979. Position 4296 associated with atovaquone-proguanil resistance is boxed: a4296g = Y268C, a4296c = Y268S; other nonsynonymous polymorphisms are: g869t = S207Y, t891c = I200V, g4389a = S299N. Dots indicate identity with the reference sequence at the top, and dashes indicate gaps introduced into sequences to increase their similarity.

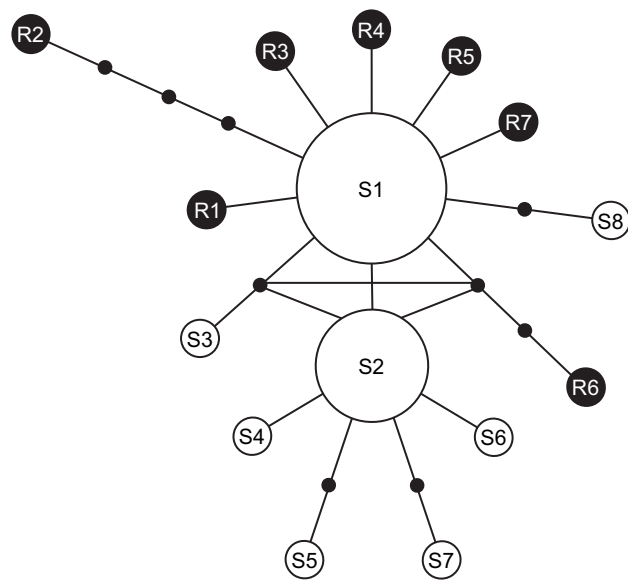


FIG. 2.—Median-spanning network showing genetic relationships among *P. falciparum* mtDNA haplotypes. Susceptible (S) and resistant (R) haplotypes are indicated with white and black, respectively. Numbers refer to the haplotypes listed in fig 1. The nucleotide position 4296 (corresponding to the codon 268 of *pfcytb*) involved in atovaquone-proguanil resistance has been removed to consider only the neutral variation. Lines represent one mutational step, and small black circles are hypothetical missing intermediates. Circle size is proportional to haplotype frequency. See Supplementary Online Material for details on the method used to construct the network.

here show that the 2 adaptive nucleotide changes in the *pfcytb* gene, a4296c and a4296g, each occurred repeatedly in different lineages from varied geographic regions. Further, we show that these APR alleles occurred and spread within at least 6 of the 7 patients under atovaquone or AP treatment selection.

Parallel evolution of APR alleles was suspected from the epidemiology of atovaquone resistance (Looareesuwan et al. 1996; Schwartz, Bujanover, and Kain 2003) and is formally demonstrated here. This situation contrasts with the very few origins and extensive spread of the *pfcr* and *pfdhfr* mutant alleles that determine chloroquine and pyrimethamine resistance, respectively (Cortese et al. 2002; Wootton et al. 2002; Nair et al. 2003; Roper et al. 2003; Ariey et al. 2006). These different patterns in drug resistance evolution might be primarily explained by the different dynamics in the acquisition of the resistance mechanisms. Resistance to chloroquine and pyrimethamine arose by sequential additions of SNPs at the *pfcr* and *pfdhfr* loci, respectively (Anderson and Roper 2005). It is extremely unlikely that these complex resistant haplotypes occurred during replications within a patient (Hastings 2004). In contrast, atovaquone resistance is conferred by one SNP that has a major effect on susceptibility to AP (Fivelman, Adagu, and Warhurst 2004; Musset et al. 2006). Theory predicts that the same beneficial allele might enter a population several times by recurrent mutation when the population-level mutation parameter $2N_e\mu > 0.01$, where N_e is the effective population size and μ the per generation rate of mutation to the beneficial allele (Pennings

P ^a	Time ^a	H ^a	Mitochondrial genome nucleotide position ^b																	Microsatellite ^c							
			6	7	7	8	8	1	1	1	1	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4	5	T	T	A	P	T
			6	7	7	8	8	1	1	1	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4	5	A	A	R	f	A	
			8	1	1	6	9	6	0	9	7	1	4	6	1	9	8	5	2	8	5	5	A	A	A	P	A
			4	0	1	9	1	5	9	4	8	3	9	7	9	6	9	2	4	0	4	4	8	6	2	K	8
			A	-	-	G	T	G	A	G	T	C	C	C	A	A	G	C	A	G	C	-	7	0	2	2	1
1	D26	R1	.	-	-	G	-	83	89	104	168	178
1	D0		.	-	-	-	83	89	104	168	178
2	D39	R2	.	-	-	T	.	.	T	C	T	T	83	77	101	171	175
2	D0		nd	nd	nd	nd	nd	nd	T	.	.	nd	nd	nd	nd	.	.	nd	nd	nd	nd	nd	83	77	101	171	175
3	D28	R3	.	-	-	T	.	C	-	83	86	110	174	172
3	D0		.	-	-	T	-	83	86	110	174	172
4	D22	R4	.	-	-	G	A	-	80	71	98	165	175
4	D0		.	-	-	A	-	80	71	98	165	175
6	D26	R6	.	-	-	.	.	A	.	T	C	.	.	G	.	.	-	92	86	104	165	178
6	D0		.	-	-	.	.	A	.	T	G	.	.	-	92	86	104	165	178
7	Dfail	R7	.	-	-	C	C	-	95	77	104	165	175
7	D0		.	-	-	C	-	95	77	104	165	175

FIG. 3.—Genetic diversity within pretreatment and day-of-treatment failure paired isolates.
^a P: patient; Time refers to the number of days following the beginning of atovaquone-proguanil (AP) treatment on which the isolate was collected (D0: pretreatment isolates); H refers to the haplotypes listed in fig. 1.
^b The sequence at the top is derived from accession no. AY282979. Polymorphisms associated with AP resistance are in bold: a4296g = Y268C, a4296c = Y268S. Dots indicate identity with the reference sequence at the top, dashes indicate gaps introduced into sequences to increase their similarity, and nd indicates not determined.
^c Allele lengths (bp) are shown for 5 microsatellite loci; number in bold is the dominant allele when more than 1 allele per locus was identified per isolate.

and Hermisson 2006a). With an estimated μ for the atovaquone resistance allele of 10^{-5} to 10^{-8} (Gassis and Rathod 1996) and an estimated N_e of 10^5 in the African *P. falciparum* population (Joy et al. 2003), $2N_e\mu$ is included between 0.002 and 2. This is consistent with our observation of multiple origins of the selected allele. A recent study demonstrated recurrent amplification of the *pfmdr1* gene during the evolution of multidrug resistance in malaria parasites from Southeast (SE) Asia (Nair et al. 2007). Although mutation rates in eukaryotes are generally lower for point mutations than for copy number change (Inoue and Lupski 2002), our data support that parallel evolution is also likely to occur when adaptation is conferred by simple genetic change like one SNP. However, in contrast with the evolution of *pfmdr1* gene copy number in SE Asia, the evolution of APR alleles occurred in the situation where AP pressure on *P. falciparum* populations is not at a high level nor is it sustained, mainly because the high cost of AP precludes its widespread use. As observed by Nair et al. (2007), it is expected that the different haplotypes linked to each independent copy of the beneficial allele will be retained and will spread in the population under selection. The signature of such a selective sweep from recurrent beneficial mutation in recombining autosomes, also called “soft sweep”, has been described theoretically (Pennings and Hermisson 2006b). Therefore, methods that detect “soft sweep” and the classical “hard sweep” signatures should both be considered when patterns of DNA polymorphism are used to find novel resistance loci in *P. falciparum*.

Acknowledgments

We thank all collaborating centers for their participation in collecting materials and data. This work was supported by the French Ministry of Health (grant to the Centre National de Référence du Paludisme). L.M. is the recipient of a Ph.D. grant from the French Ministry of Education and Research. We thank Philippe Deloron, Erick Denamur, and David Fidock for critical reading of the manuscript, and Olivier Tenaillon and Gilles Cottrell for helpful suggestions. We also thank the anonymous referees for helpful suggestions and comments.

Literature Cited

Anderson TJ, Roper C. 2005. The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers. *Acta Trop.* 94:269–280.
 Ariey F, Fandeur T, Durand R, et al. (13 co-authors). 2006. Invasion of Africa by a single *pfert* allele of South East Asian type. *Malar J.* 5:34.
 Boucher CA, O’Sullivan E, Mulder JW, Ramautarsing C, Kellam P, Darby G, Lange JM, Goudsmit J, Larder BA. 1992. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J Infect Dis.* 165:105–110.
 Colosimo PF, Hosemann KE, Balabhadra S, Villarreal G Jr, Dickson M, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Schluter D, Kingsley DM. 2005. Widespread parallel evolution in

- sticklebacks by repeated fixation of Ectodysplasin alleles. *Science*. 307:1928–1933.
- Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe CV. 2002. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *J Infect Dis*. 186:999–1006.
- Cunningham CW, Jeng K, Husti J, Badgett M, Molineux IJ, Hillis DM, Bull JJ. 1997. Parallel molecular evolution of deletions and nonsense mutations in bacteriophage T7. *Mol Biol Evol*. 14:113–116.
- Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. 2004. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:4097–4102.
- Gassis S, Rathod PK. 1996. Frequency of drug resistance in *Plasmodium falciparum*: a nonsynergistic combination of 5-fluoroorotate and atovaquone suppresses in vitro resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 40:914–919.
- Hastings IM. 2004. The origins of antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol*. 20:512–518.
- Inoue K, Lupski JR. 2002. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 3:199–242.
- Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, et al. (12 co-authors). 2003. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*. 300:318–321.
- Kessl JJ, Ha KH, Merritt AK, Lange BB, Hill P, Meunier B, Meshnick SR, Trumppower BL. 2005. Cytochrome *b* mutations that modify the ubiquinol-binding pocket of the cytochrome *bc1* complex and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 280:17142–17148.
- Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. 2000. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:2100–2108.
- Looareesuwan S, Viravan C, Webster HK, Kyle DE, Hutchinson DB, Canfield CJ. 1996. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 54:62–66.
- Musset L, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J. 2006. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. *Microb Inf*. 8:2599–2604.
- Nair S, Williams JT, Brockman A, et al. (12 co-authors). 2003. A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in southeast asian malaria parasites. *Mol Biol Evol*. 20:1526–1536.
- Nair S, Nash D, Sudimack D, Jaidee A, Barends M, Uhlemann AC, Krishna S, Nosten F, Anderson TJ. 2007. Recurrent gene amplification and soft selective sweeps during evolution of multidrug resistance in malaria parasites. *Mol Biol Evol*. 24:562–573.
- Pennings PS, Hermisson J. 2006a. Soft sweeps II—molecular population genetics of adaptation from recurrent mutation or migration. *Mol Biol Evol*. 23:1076–1084.
- Pennings PS, Hermisson J. 2006b. Soft sweeps III: the signature of positive selection from recurrent mutation. *PLoS Genet*. 2:e186.
- Roper C, Pearce R, Breckenkamp B, Gumede J, Drakeley C, Mosha F, Chandramohan D, Sharp B. 2003. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet*. 361:1174–1181.
- Schwartz E, Bujanover S, Kain KC. 2003. Genetic confirmation of atovaquone-proguanil-resistant *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a nonimmune traveler to East Africa. *Clin Infect Dis*. 37:450–451.
- Wichman HA, Badgett MR, Scott LA, Boulianne CM, Bull JJ. 1999. Different trajectories of parallel evolution during viral adaptation. *Science*. 285:422–424.
- Wichman HA, Scott LA, Yarber CD, Bull JJ. 2000. Experimental evolution recapitulates natural evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 355:1677–1684.
- Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ. 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 418:320–323.
- Zhang J, Kumar S. 1997. Detection of convergent and parallel evolution at the amino acid sequence level. *Mol Biol Evol*. 14:527–536.

Geoffrey Mc Fadden, Associate Editor

Accepted April 19, 2007

Supplementary material

available at Molecular Biology and Evolution online (<http://www.mbe.oxfordjournals.org/>).

Material and methods

Isolate sampling

Seven *P. falciparum* resistant isolates were collected at the day of treatment failure (Dfail). Six were obtained from travellers infected in West Africa (Côte d'Ivoire, n=2; Burkina Faso, n=3; Guinea, n=1) and treated in France with AP, and one from a patient infected and treated in Thailand with atovaquone alone (culture-adapted isolate provided by Malaria Research and Reference Reagent Resource Center: strain Tm90C2b). The African isolates were collected in several clinical centers in France. In addition, parasites isolated before initiation of the treatment (D0) were available from six of these failure cases (5 African and the Thai strain Tm90C2a). All the Dfail isolates carried either the a4296g (n=2) or the a4296c (n=5) single nucleotide polymorphism in the *pfcytb* gene, replacing tyrosine 268 with a cysteine (Y268C) or a serine (Y268S), respectively, whereas all the D0 isolates carried the wild type *pfcytb* allele. A detailed description of parasitological and clinical data has been reported elsewhere (Musset et al., 2006). Twenty-eight pretreatment isolates from patients who were successfully cured by AP (D0^{control} isolates) were also included in the study. These susceptible isolates were selected to match the year and the African country of origin (Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Guinea) of the samples from uncured patients, and all carried the wild type *pfcytb*268 allele.

Parasite DNA extraction

Parasite DNA was extracted from 200 µl of whole blood by using the QIAamp DNA kit, as recommended by the manufacturer (Qiagen). For one patient, the DNA of the D0 isolate was extracted from a Giemsa-stained blood smear.

Mitochondrial genome amplification and sequencing

Five overlapping fragments of 1.2–1.5 kb covering the entire mt genome were amplified. The PCR mixture contained 0.3 µM of each primer, 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 2 µl of DNA and 2.5 units of *Taq* polymerase in a final volume of 25 µl. Amplifications were performed with the following conditions: 95°C for 10 min, 30 cycles of 95°C for 60 s, 55°C for 30 s, 72°C for 80 s and a final elongation step of 72°C for 10 min. The PCR products were treated with Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) and one strand was directly sequenced using Big Dye Terminator v1.1 chemistry on a ABI3130 DNA sequencer (Applied Biosystems). The sequence of the primers used to amplify and sequence the *P. falciparum* mt genome are described in Table S1. All electrophoregrams were visually confirmed. For the D0 and Dfail isolates from the seven AP treatment failures, each sequence variation was validated by sequencing both strands of a second independent PCR.

Sequence analysis

Mitochondrial genome sequences were aligned with a reference sequence (Genbank accession number AY282979) which is the most common mitochondrial haplotype in Africa (Joy et al., 2003) using the Multalin program (Corpet, 1988).

Mean numbers of pairwise nucleotide differences were estimated using MEGA version 3.1 (Kumar, Tamura and Nei, 2004). Sites at which a gap was introduced into any sequence to

increase sequence similarity were excluded from all pairwise comparisons. Haplotypes S1 and S2 were included only once each in the D0^{control} data set.

The network describing relationships among mt haplotypes was generated using the NETWORK program with the median-joining algorithm (Bandelt, Forster and Röhl, 1999). Only the 28 pretreatment susceptible haplotypes (D0^{control}) and the 7 resistant haplotypes were included in the data set (see Fig. 1). The nucleotide position 4296 (corresponding to the codon 268 of *pfcytb*) involved in AP drug resistance was excluded from the data set to construct the network because this position is known to be under selection.

Microsatellite genotyping

To further explore the genetic background of each isolate, we analyzed five microsatellite markers highly polymorphic in African populations and distributed throughout the nuclear genome of *P. falciparum* (Table S2; Anderson et al., 2000). Microsatellite *loci* were amplified with a multiplex strategy. Briefly, the PCR mixture contained 200 μ M dNTPs, 5 mM MgCl₂, 2.5 units of *Taq* polymerase and 1 μ l of DNA in a final volume of 25 μ l. Primer concentrations are described in Table S2. Amplifications were performed with the following conditions: 95°C for 10 min, 30 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final elongation step of 72°C for 15 min. After amplification, 1 μ l of the reaction mixture, containing the five amplified *loci*, was analyzed by electrophoresis with a ROX 350 ladder on an ABI310 DNA analyser (Applied Biosystems). Electrophoregrams were analyzed by the Genscan analysis software. Multiplex amplification and electrophoresis were performed a second time from a DNA template separately extracted for each isolate.

Detection of minority mutant pfcytb268 allele

We adapted the “enriched” PCR amplification (Kahn et al., 1991) to detect minority parasite populations harbouring the mutant *pfcytb268* allele. Its principle is based on selective PCR amplification of mutant *pfcytb268* sequences employing a two-step strategy.

First step amplification: The PCR mixture contained 12 nM of each primer (forward: 5'-TTTATTGGATTATGTATTGTATTTATAC-3'; reverse: 5'-TTACTTGGAACAGTTTTTAACAAT-3'), 4 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 2 μl DNA and 1.25 units of *Taq* polymerase in a final volume of 25 μl. The nucleotide underlined in the reverse primer creates an *Nsi*I enzyme restriction site for the wild type but not the mutant *pfcytb268* sequences. Amplifications were performed with the following conditions: 95°C for 10 min, 15 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final elongation step of 72°C for 7 min.

Intermediate digestion: 10 μl of the first PCR product were digested with 4 units of the restriction enzyme *Nsi*I in a final volume of 40 μl, at 37°C for 4h.

Second step amplification: 10 μl of the intermediate digests was used in the second amplification step as template. The PCR mixture contained 390 nM of each primer (forward: 5'-TTTATTGGATTATGCATTGTATTTA-3' ; reverse: 5'-TTACTTGGAACAGTTTTTAACAAT-3'), 4 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, and 2.5 units of *Taq* polymerase in a final volume of 50 μl. A second *Nsi*I enzyme restriction site was created (nucleotide underlined in the forward primer) as a control of digestion efficiency. Amplifications were performed with the following conditions: 95°C for 10 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final elongation step of 72°C for 7 min.

Final digestion: 16 μl of the second PCR product were digested with 4 units of *Nsi*I in a final volume of 50 μl, at 37°C for 4h.

Products were analysed through a 10% acrylamide gel. Gels were stained with ethidium bromide, and photographed on an UV transilluminator. Minority mutant sequences representing up to 0.1 % of the total sequences before amplification were detected in experiments with artificial mutant plus wild type sequence mixtures (Fig S1).

Table S1. Primers used for PCR and sequencing of *P. falciparum* mitochondrial genome

Primers	Sequences	mt nucleotides
mt-F1	5' -AAGCTTTTGGTATCTCGTAAT-3'	1-21
mt-R1	5' -TTCATCTTTAACTTCTGGTATGT-3'	1288-1310
mt-F2	5' -TGGATATGGTGATAAACTAAAAT-3'	1208-1230
mt-R2	5' -CTAGGATATGCTAATTCTGGAG-3'	2321-2342
mt-F3	5' -CTTTCTACCTATTTTATGTGGA-3'	2298-2319
mt-R3	5' -GGTAATTTATTAAGTGTGCTTTA-3'	3518-3540
mt-F4	5' -ATGAACTTTTACTCTATTAATT-3'	3492-3513
mt-R4	5' -TTATATGTTTGCTTGGGAGCT-3'	4602-4622
mt-F5	5' -TATGGTTTATGTGTGCATTCTATG-3'	4450-4473
mt-R5	5' -TTAATGAAAAGGATTTGACGG-3'	42-62
mt-F1 ^a	5' -TTGAAACAGGACATACAT-3'	710-727
mt-R2 ^a	5' -TTCTTATAGTGTAGGCCA-3'	1902-1919
mt-F3 ^a	5' -TTACTTCGACTACCATTT-3'	2969-2986
mt-F4 ^a	5' -TACCTTTATCACATCCTG-3'	4204-4221
mt-F5 ^a	5' -TCTCCTGTTCTAAAATTC-3'	5310-5327
mt-R5 ^a	5' -CAGGAAAATAATAGACCG-3'	5135-5152

^a primers used for sequencing only.

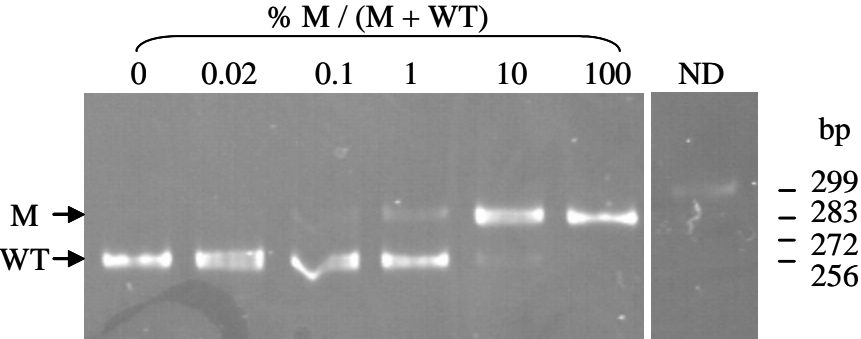
Table S2. Microsatellite *loci* selected and associated primers.

Marker name	Chr	Genbank number	Primer sequence (5'-3') ^a	Primer ^b concentration (pM)
TAA87	6	G38838	5' -ACATGTTTCATATTACTCACCA-3'	1
			5' Fam-CATTCAACCACCTAACAAC-3'	0.33-0.66*
TAA60	13	G38876	5' -GGTAAAAAAGGAGGATAAAT-3'	7.5
			5' Ned-AAGTAGGAACGATGTTGACAAA-3'	3.75-3.75*
ARA2	11	G37848	5' -TCCGCTTTGAGTATTATTA-3'	7.5
			5' Hex-TTAAAAACCAGAATTATCTAA-3'	7.5
PfPK2	12	G37852	5' -ATTCCTTTCATCGATACTAC-3'	3
			5' Hex-AAAGAAGGAACAAGCAGA-3'	0.75-2.25*
TAA81	5	G38836	5' -CATTTACACAACACAGGATT-3'	1
			5' Fam-GAAATAAGGGAAGGTGAGGA-3'	0.33-0.66*

^a Upper sequence: forward primer; lower 5'-labeled sequence: reverse primer. Fam : 6-carboxyfluorescein; Ned : trichloro-6-carboxy-fluorescein; Hex : hexachloro-6-carboxy-fluorescein.

^b Numbers with an asterisk indicate the concentration at which non labelled reverse primer was added to the reaction mix to decrease fluorescence signal intensity and allow a multiplex analysis.

Fig S1. Selective PCR amplification of the mutant *pfcytb268* allele.



M: mutant; WT: wild type; ND: non digested; the ratio $M/(M+WT)$ was adjusted for the *pfcytb* gene copy number of the mutant and the wild type strains used.

Fig. S2. Genetic diversity within atovaquone-proguanil susceptible parasites (D0^{control} isolates)

Origin ^a	H ^b	Mitochondrial genome nucleotide positions ^c																	Microsatellites ^d							
		6	7	7	8	8	1	5	6	7	9	6	1	6	2	3	5	6	7	9	4	T	T		P	T
		A	-	-	G	T	G	A	G	T	C	C	C	A	A	G	C	A	G	C	-	86	89	94	162	178
IVC	S1	.	-	-	-	86	89	94	162	178
IVC	S1	.	-	-	-	95	89	100	189	190
IVC	S1	.	-	-	-	80	77	100	156	172
IVC	S1	.	-	-	-	77	77	103	165	178
IVC	S1	.	-	-	-	86	77	106	165	169
IVC	S2	.	-	-	A	-	68	77	103	186	181	
IVC	S2	.	-	-	A	-	83	80	100	165	172	
IVC	S2	.	-	-	A	-	68	77	103	186	181	
IVC	S2	.	-	-	A	-	86	83	94	165	178	
IVC	S3	.	-	-	C	T	-	83	77	103	171	178	
UPV	S1	.	-	-	-	83	86	109	162	172	
UPV	S1	.	-	-	-	95	83	103	162	178	
UPV	S1	.	-	-	-	89	80	115	171	181	
UPV	S1	.	-	-	-	83	89	106	162	175	
UPV	S2	.	-	-	A	-	101	80	103	168	181	
UPV	S2	.	-	-	A	-	89	80	97	168	184	
UPV	S4	.	-	-	.	C	.	.	A	-	86	77	106	168	175	
UPV	S5	.	-	-	A	.	.	T	T	.	.	-	113	80	106	168	178	
GUI	S1	.	-	-	-	83	77	100	168	175	
GUI	S1	.	-	-	-	86	89	109	162	178	
GUI	S1	.	-	-	-	92	98	97	168	178	
GUI	S1	.	-	-	-	92	77	97	165	181	
GUI	S2	.	-	-	A	-	86	77	94	159	172	
GUI	S2	.	-	-	A	-	89	80	94	168	163	
GUI	S2	.	-	-	A	-	89	89	100	165	187	
GUI	S6	.	-	-	A	T	-	82	77	103	192	172	
GUI	S7	.	A	T	A	-	89	86	124	183	172	
GUI	S8	G	-	-	T	-	89	89	100	171	169	

^a According to the international code of the country of infection, IVC: Côte d'Ivoire, UPV: Burkina Faso, GUI: Guinea.

^b H: haplotype ; S refers to the haplotypes listed in figure 1.

^c Nucleotide positions are the same as in figure 1. The sequence at the top (Accession no. AY282979) is the most common mt haplotype present in Africa according to Joy et al. 2003. Dots indicate identity with the reference sequence at the top, and dashes indicate gaps added to increase sequences similarity.

^d Allele lengths (bp) are shown for five microsatellite *loci*; the number in bold is the dominant allele when more than one (up to four) allele *per locus* was identified *per isolate*.

Supplementary References

Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, et al. (16 co-authors). 2000. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol. Biol. Evol. 17:1467-1482.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 16:37-48.

Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res. 16:10881-10890.

Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, et al. (12 co-authors). 2003. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. Science 300:318-321.

Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z. 1991. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant *K-ras* genes via 'enriched' PCR amplification. Oncogene 6:1079-1083.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5:150-163.

Musset L, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J. 2006. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. Microb. Inf. 8:2599-2604.